



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**PARASITISMO POR *GIARDIA* SPP. EM CANIS DE CRIAÇÃO NA REGIÃO DE VISEU,
PORTUGAL**

ÂNGELO DUARTE PITÃES FERNANDES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca
de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Dr. Abel Nuno Calçada Fernandes

ORIENTADOR

Dr Abel Nuno Calçada Fernandes

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de
Carvalho

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**PARASITISMO POR *GIARDIA* SPP. EM CANIS DE CRIAÇÃO NA REGIÃO DE VISEU,
PORTUGAL**

ÂNGELO DUARTE PITÃES FERNANDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca
de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Dr. Abel Nuno Calçada Fernandes

ORIENTADOR

Dr Abel Nuno Calçada Fernandes

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de
Carvalho

2012

LISBOA

“Uma mente que se abre a uma nova ideia jamais retoma a sua forma original”

Albert Einstein

À minha mãe, ao meu irmão e à minha irmã

Porque sempre me apoiaram e muito sacrificaram para eu perseguir este sonho,

Por tudo que vivemos, por tudo que perdemos,

Nada tem valor se não o vivermos juntos

À mãe, ao pai e à Sara

Porque, apesar dos anos passarem e a distância existir ou não, nunca nos afastamos de verdade

Sempre me deram mais do que eu poderia pedir

AGRADECIMENTOS

A realização e apresentação deste trabalho significam o fim de um percurso académico inundado de conhecimentos, amizades e experiências que guardo com muito orgulho pelo impacto que tiveram na minha vida até este momento. Assim tenho de reconhecer e agradecer o apoio das pessoas que tornaram possível esta caminhada até aqui.

Ao Dr Abel Fernandes por todos os conhecimentos e experiências partilhadas pondo os meus à prova incentivando a minha vontade de aprender, apoio e orientação constantes e acima de tudo pela alegria com que exerce esta prestigiada profissão.

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, pelo entusiasmo e vontade com que sempre transmite conhecimentos e cativa os seus alunos. Pela disponibilidade e apoio desde o primeiro instante, pelo incentivo e acompanhamento constantes durante o estágio e na realização do trabalho.

À equipa do SOS Animal - Hospital Veterinário de Viseu, por me receberem da melhor maneira possível e por terem proporcionado um período de estágio recheado de boas experiências. À Dra Liliana Antunes e D. Filomena Cunha pois sem a sua contribuição não teria sido possível realizar este estudo. Aos médicos veterinários do SOS Animal, Dra Liliana Antunes, Dra Ana Dias, Dra Joana Fernandes e Dr Nuno Guedes por tudo que me ensinaram, pela alegria com que o fizeram criando um excelente ambiente durante todo o meu percurso. Às enfermeiras Ana Marlene Teixeira e Daniela Ferraz pela simpatia e experiência, mostrando um lado muitas vezes negligenciado mas importante da medicina veterinária.

À Virbac, na pessoa do Dr Francisco Ferraz por disponibilizar os testes rápidos Speed[®] Giardia, indispensáveis no modelo de estudo idealizado e pela cordialidade e disponibilidade que sempre demonstraram. Tenho ainda de agradecer a importante ajuda da Professora Doutora Berta São Braz por facilitar o contacto com o Dr Francisco Ferraz

À Dra Lídia Gomes, porque sem a sua preciosa orientação no laboratório dificilmente poderia terminar este trabalho.

Ao Dr Telmo Nunes pela preciosa orientação no tratamento estatístico dos dados recolhidos.

À Faculdade de Medicina Veterinária, a todas as pessoas que fazem desta instituição um lugar de excelência na formação veterinária no nosso país. A todos os professores que se esforçam por iluminar mentes capazes, a todos os funcionários que são peça fundamental no dia-a-dia da instituição e aos animais que pelas nossas mãos passam e nos relembram o que é ser veterinário.

À AEFMV e a todos que dela fizeram parte durante a minha passagem, em especial à Ausenda Pais, por tudo que faz pela Associação e por quem lá passa.

A todos os colegas e amigos que partilharam estes últimos 6 anos na FMV, em especial ao Joel Mendes, Rui Silva e Vasco Simões que foram uns companheiros e amigos de excelência nesta caminhada, sem os quais não teria sido possível alcançar este momento.

Aos meus “amigos bracarenses” Pedro, Marina e Cristina, não há palavras para descrever todos estes anos de amizade.

Ao Tó, à Beta e à Marta, a minha família lisboeta, por todo o apoio desde o primeiro dia em que cheguei a Lisboa, nada disto teria sido possível sem a vossa ajuda

.
À minha família, que tudo deram para que eu pudesse trilhar este caminho no meio de tanta adversidade e sempre me acompanharam para que não falhasse as oportunidades de seguir esta ambição. Este sonho foram vocês que realizaram.

Por fim, à minha Chienne, a principal razão da vontade de ser veterinário.

RESUMO

Os protozoários do género *Giardia* spp são parasitas de distribuição mundial e infectam vários tipos de hospedeiros entre os quais mamíferos domésticos e silvestres. Têm a capacidade de se manter na natureza durante várias semanas e são infectantes logo após a sua excreção. Provocam episódios de diarreia aguda intermitente tanto em humanos como em animais, sendo parasitas gastrointestinais muito comuns em locais com elevada densidade animal como é o caso dos cães e a sua contínua elevada prevalência em cães pode potenciar o seu risco zoonótico.

Considerando estes aspectos foi realizado um estudo parasitológico em 2 canis de criação diferentes na região de Viseu (Portugal), avaliando um total de 51 cães de diversas raças. Este estudo procurou avaliar a prevalência de *Giardia* spp. neste tipo de instalações, assim como as associações entre os parâmetros sexo, idade, raça, medicação, doenças e desparasitações. As amostras foram submetidas a 3 métodos de diagnóstico: teste imunocromatográfico rápido Speed[®] *Giardia* (BVT, Virbac), flutuação passiva com ZnSO₄ e esfregaço fecal com coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada.

Entre os 2 canis estudados apenas um revelou a presença de *Giardia* e foi detectada uma prevalência final de 21,6% (11/51). De acordo com os 3 testes de diagnóstico obtivemos uma prevalência de 21,6% através do teste rápido Speed[®] *Giardia*, 19,6% (10/51) pelo método de flutuação passiva com ZnSO₄ e de 17,6% (9/51) pela coloração com a técnica de Ziehl-Neelsen. No cômputo geral a prevalência média foi de 19,6% entre os 3 métodos. Com base na análise estatística pelo teste de qui-quadrado foi detectada apenas uma associação significativa ($p < 0,05$) entre a prevalência de *Giardia* e os animais do sexo feminino.

Neste estudo foi possível comparar os 3 métodos de diagnóstico e as suas vantagens do ponto de vista do utilizador com maior ou menor experiência. Foi analisado o impacto dos esquemas de desparasitação interna e externa e de limpeza e desinfecção das instalações tendo sido demonstrado um risco superior para a prevalência de *Giardia*, em canis com elevado número animais. Acima de tudo foi possível demonstrar que as elevadas prevalências de *Giardia* spp. em cães previamente descritas em canis municipais e abrigos para animais, também são detectadas em canis de criação pese o facto de existirem condições consideravelmente diferentes.

Palavras-chave: Cães, Canis de Criação, *Giardia*, Teste Speed[®] *Giardia*, testes coprológicos, prevalência, risco de infecção

ABSTRACT

Giardia spp. are protozoans parasites of worldwide distribution able to infect many types of hosts, including domestic and wild mammals, being able to survive in the environment for several weeks and is infective soon after its excretion. Capable of causing intermittent episodes of acute diarrhea in humans and animals alike, is a very common gastrointestinal parasite in places where inhabit various animals in higher density such as kennels, and their continuous high prevalence in dogs can potentiate zoonotic risk.

Considering these aspects, a study was conducted at 2 different breeding kennels in the region of Viseu (Portugal), assessing a total of 51 dogs of various breeds. This study sought to evaluate the prevalence of *Giardia* in this type of animal facility, as well as the associations between *Giardia* spp. infection regarding the sex, age, breed, medication, pathologies and deworming protocols. The samples were subjected to 3 diagnostic methods: Immunochromatographic Speed[®] *Giardia* test (BVT, Virbac), passive fluctuation with ZnSO₄ and a fecal smear stained by a modified Ziehl-Neelsen technique.

Between the 2 studied kennels, only one revealed the presence of *Giardia* spp. with a final prevalence of 21,6% (11/51). According to the 3 different diagnostic methods we obtained a prevalence of 21.6% according to the Speed[®] *Giardia* test, 19.6% (10/51) by passive flotation method with ZnSO₄ and 17.6% (9/51) with Ziehl-Neelsen technique. On balance the average prevalence was 19,6% considering the 3 methods. Based on statistical analysis by Chi-square test it was detected only one significant association ($p < 0.05$) between the prevalence of *Giardia* spp. and female dogs. In this study it was possible to compare the 3 diagnostic methods and their advantages from the point of view of the user with greater or lesser experience. The impact of deworming schemes and internal and external cleaning and disinfection of the premises was analyzed, having been shown a higher risk for the prevalence of *Giardia* spp., in kennels with a higher number of animals. Above all, it was possible to demonstrate that the high prevalence of *Giardia* spp. previously described in dogs from municipal kennels and animal shelters is also detected in breeding kennels, which appear to have considerably different conditions.

Keywords: Dogs, Breeding Kennels, *Giardia*, Speed[®]*Giardia*, faecal tests, prevalence, infection risk

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ÍNDICE GERAL.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS	x
I. INTRODUÇÃO	1
II. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO CURRICULAR.....	1
1. Actividades no SOSAnimal – HVV.....	1
2. Actividades no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL	4
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1. Nota Histórica	6
2. Taxonomia	6
2.1. Género <i>Giardia</i>	7
3. Biologia Celular	8
3.1. Morfologia.....	9
3.2. Diferenciação celular.....	13
3.2.1. Transformação quisto/trofozoíto.....	13
4. Ciclo biológico.....	13
5. Epidemiologia	15
5.1. Potencial e risco zoonótico.....	16
6. Sinais clínicos	19
7. Patogenia.....	19
8. Prevalência	21
9. Diagnóstico	22
9.1. Análises coprológicas microscópicas	23
9.2. Testes imunológicos para detecção de antígenos de <i>Giardia</i>	24
9.3. Métodos moleculares para pesquisa de ADN de <i>Giardia</i> - PCR	25
10. Tratamento	25
10.1. Febendazol.....	25
10.2. Febantel/Pirantel/Praziquantel.....	26
10.3. Metronidazol.....	26
10.4. Albendazol.....	27
10.5. Outras opções de tratamento.....	27

11. Prevenção e controlo	28
IV. Estudo Prático – Parasitismo por <i>Giardia</i> spp. em canis de criação na região de Viseu, Portugal	29
1. Objectivos	29
2. Material e métodos	29
2.1. Locais	29
2.2. Canil/Criador nº1 (C1)	29
2.3. Canil/Criador nº2 (C2)	30
2.4. Amostras.....	30
2.5. Análise estatística	30
2.6. Análise e exames parasitológicos	31
3. Resultados	32
3.1. Caracterização da amostra no C1	32
3.2. Caracterização da amostra do C2	33
3.3. Prevalência de <i>Giardia</i> spp.	36
3.3.1. Prevalência por idade	37
3.3.2. Prevalência por sexo	37
3.3.3. Prevalência por raça	38
3.3.4. Prevalência e medicação, doença e desparasitações	39
4. Discussão	41
4.1. Técnicas de diagnóstico.....	41
4.2. Prevalência e parâmetros.....	43
4.2.1. Idade.....	43
4.2.2. Sexo.....	43
4.2.3. Raça.....	44
4.2.4. Desparasitações, medicação e doenças	44
4.3. Prevalências e canis.....	45
5. Conclusão.....	48
6. Perspectivas futuras.....	50
BIBLIOGRAFIA	51
ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem esquerda – <i>Demodex canis</i> obtido após raspagem em Caniche. Objectiva 40x Imagem direita – <i>Cheyletiella yasguri</i> obtido pelo método de fita-cola em Cocker Spaniel. Objectiva 10x. Fonte: Original	3
Figura 2 – Icterícia em canídeo de raça indeterminada por <i>Babesia canis</i> . Fonte: Imagem cedida pelo SOSAnimal - HVV	3
Figura 3 - Imagem esquerda – Bolsa escrotal tumefacta e com zona de necrose. Imagem direita – Testículos e bolsa escrotal após remoção cirúrgica (Torsão testicular). Fonte: Imagem cedida pelo SOSAnimal - HVV	4
Figura 4 - Esquema de trofozoíto de <i>G. duodenalis</i> . Adaptado de Faubert (2000)	9
Figura 5 – Corte transversal de trofozoíto. Realce para a presença dos núcleos (N), flagelos (F), vacúolos (V) e retículo endoplasmático (ER). Fonte: Adam (2001)	10
Figura 6 – Vista ventral de trofozoíto de <i>Giardia</i> por foto electrónica de varrimento com coloração digital. Fonte: Erlandsen (2005b).....	11
Figura 7 – Representação esquemática comparativa entre trofozoíto e quisto e suas estruturas chave. Fonte: Ankarklev <i>et al</i> (2010).....	12
Figura 8 – Mitossomas de <i>G. intestinalis</i> em marcação imunofluorescente. Fonte: Tachezy & Dolezal (2011).....	12
Figura 9 – Ciclo biológico de <i>Giardia</i> spp. Adaptado de Smith & Paget (2007).....	14
Figura 10 – Desenquistamento (esq) e fissão binária (dir). Micrografia electrónica de varrimento colorida digitalmente. Fonte: (Erlandsen, 2005a).....	14
Figura 11 – Diagrama dos ciclos de transmissão de <i>Giardia</i> . Adaptado: (Hunter & Thompson, 2005)	15
Figura 12 – Ciclo de vida de <i>Giardia</i> spp. e possíveis fontes de contaminação para humanos. Adaptado: (DPDx, 2010)	17
Figura 13 – Quistos de <i>Giardia</i> , centrifugação em ZnSO ₄ . Fonte: Dryden, Payne & Smith (2006).....	24
Figura 14 – Vista de uma das zonas com boxes individuais do C1	30
Figura 15 - Kits para exames fecais HenrySchein ®. Fonte: Original	34
Figura 16 – Quistos de <i>Giardia</i> . Flutuação passiva com ZnSO ₄ . Objectiva 40x Fonte: Original	35
Figura 17 - Testes rápidos Speed® <i>Giardia</i> da BVT, Virbac. Fonte: Original	35
Figura 18 – Reagentes e aspecto das preparações submetidas à técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Fonte: Original	36
Figura 19 – Imagem esquerda: Kit para análise de amostras fecais. Imagem direita: Kits com solução e lamela. Imagem inferior: Lâminas e lamelas para observação microscópica. Fonte: Original	63
Figura 20 – Imagem superior: Suporte para lâminas e reagentes. Imagem esquerda: Lâminas após esfregaço. Imagem direita: Lâminas após coloração. Fonte: Original	65
Figura 21 – Imagem esquerda: Frasco com reagente e colher. Imagem direita: Fita de teste em solução. Fonte: Original	66
Figura 22 – Tira imunocromatográfica Speed® <i>Giardia</i> – Resultado negativo. Fonte: Original	67
Figura 23 - Tira imunocromatográfica Speed® <i>Giardia</i> – Resultado positivo. Fonte: Original.....	67
Figura 24 - Quisto de <i>Giardia</i> . Flutuação passiva com ZnSO ₄ , Objectiva 40x. Fonte: Original	72
Figura 25 - Quisto de <i>Giardia</i> . Flutuação passiva com ZnSO ₄ , objectiva 10x. Fonte: Original	72
Figura 26 - Quisto de <i>Giardia</i> . Flutuação passiva com ZnSO ₄ , objectiva 100x. Fonte: Original	73
Figura 27 - Quisto de <i>Giardia</i> . Coloração com técnica de Ziehl-Neelsen modificada, objectiva 100x. Fonte: Original	73
Figura 28 – <i>Toxascaris leonina</i> , flutuação passiva com ZnSO ₄ , objectiva. 10x. Fonte:Original.....	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de <i>Giardia</i> e seus hospedeiros. Adaptado de Tangtrongsup & Scorza, 2010	8
Tabela 2 – Espécies de <i>Giardia</i> e características morfológicas. Adaptado de Adam (2001)	10
Tabela 3 – Principais factores de virulência de <i>Giardia</i> spp. Adaptado de Ankarklev <i>et al</i> (2010).	20
Tabela 4 – Prevalência de <i>Giardia</i> em cães de acordo com a sua origem, na Europa.....	22
Tabela 5 – Distribuição por canil do número de amostras recolhidas	31
Tabela 6 – Prevalência de <i>Giardia</i> de acordo com os 3 métodos utilizados.....	36
Tabela 7 – Prevalência total de acordo com os 3 métodos utilizados.....	37
Tabela 8 – Prevalência por idade (C1).....	37
Tabela 9 – Prevalência por sexo (C1)	38
Tabela 10 – Prevalência por raça (C1).....	39
Tabela 11 – Relação de prevalência com desparasitação interna/externa (C1)	39
Tabela 12 – Relação de prevalência e medicação (C1).....	40
Tabela 13 – Relação de prevalência e doenças pré-existentes (C1).....	40

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição das actividades desenvolvidas no SOSAnimal – HVV	2
Gráfico 2 – Distribuição da idade dos animais do C1.....	32
Gráfico 3 – Distribuição das raças no C1.....	33
Gráfico 4 – Distribuição das idades dos animais no C2.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ATP – Adenosina Trifosfato

BID – *Bis in die* (duas vezes por dia)

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

ESCCAP – *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites*

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EUA – Estados Unidos da América

FCI – *Fédération Cynologique Internationale*

FMV-UTL – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa

HVV – Hospital Veterinário de Viseu

IFD – Imunofluorescência Directa

IgA – Imunoglobulina A

NaCl – Cloreto de Sódio

NUPA – Não-União do Processo Ancóneo

OMS – Organização Mundial de Saúde

PPP – Período pré-patente

PO – *Per os* (por via oral)

RLCA – Ruptura do Ligamento Cruzado Anterior

RER – Retículo Endoplasmático Rugoso

SID – *Semel in die* (Uma vez por dia)

SFC – Síndrome de Fadiga Crónica

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VSP – *Variant-specific protein*

ZnSO₄ – Sulfato de Zinco

I. INTRODUÇÃO

A ubiquidade deste protozoário, a manutenção das formas infectantes durante vários meses na natureza, a possibilidade de afectar vários tipos de hospedeiros agregada à capacidade dos mesmos exibirem sintomas graves ou simplesmente se tornarem assintomáticos faz dele um caso de estudo importante e interessante, tornando-o a base de trabalho e investigação para esta dissertação. O objecto deste estudo passou pela pesquisa de *Giardia* em canis de criação, sobretudo após a sugestão de alguns estudos epidemiológicos de que estes canis assim como as pet-shops possam ter um importante papel como fonte de infecção de *Giardia* em cachorros (Itoh, Muraoka, Saeki, Aoki, & Itagaki, 2005).

Esta nossa dissertação consiste numa revisão da bibliografia referente à morfologia do parasita, seu ciclo biológico, prevalência, epidemiologia e potencial zoonótico, associada à pesquisa, análise e comparação dos resultados obtidos decorrentes das amostras recolhidas em cães de criadores na região de Viseu.

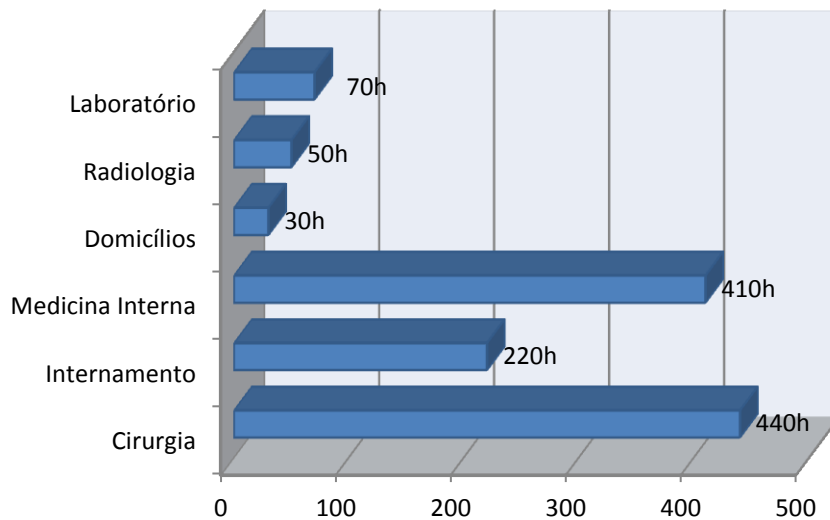
II. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO CURRICULAR

As actividades desenvolvidas no decurso do Estágio Curricular tiveram lugar no SOS Animal – Hospital Veterinário de Viseu, servindo de base para a realização desta Tese de Mestrado Integrado sobretudo pelos conhecimentos adquiridos e exposição aos casos apresentados. As amostras recolhidas nos criadores de cães da zona de Viseu foram analisadas no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL), sendo sujeitas a testes parasitológicos resultando daí os dados indispensáveis para a realização deste estudo.

1. Actividades no SOSAnimal – HVV

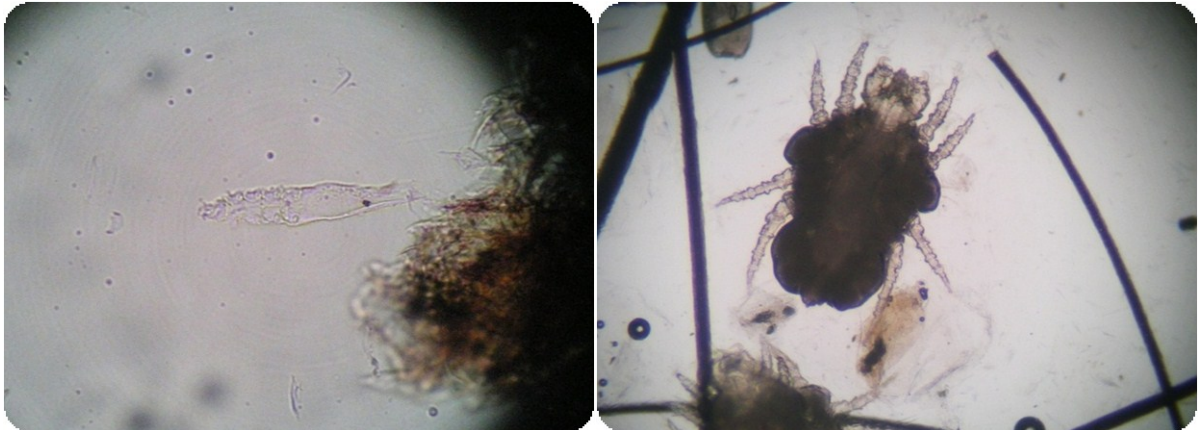
No período compreendido entre o dia 1 de Setembro de 2011 e 31 de Março de 2012 as actividades referentes ao Estágio Curricular tiveram lugar no SOSAnimal – Hospital Veterinário de Viseu, com um total de 1220 horas distribuídas em 6 áreas de actuação: Internamento (220h), Cirurgia (440h), Medicina Interna (410h), Domicílios (30h), Radiologia (50h) e Laboratório (70h).

Gráfico 1 - Distribuição das actividades desenvolvidas no SOSAnimal – HVV



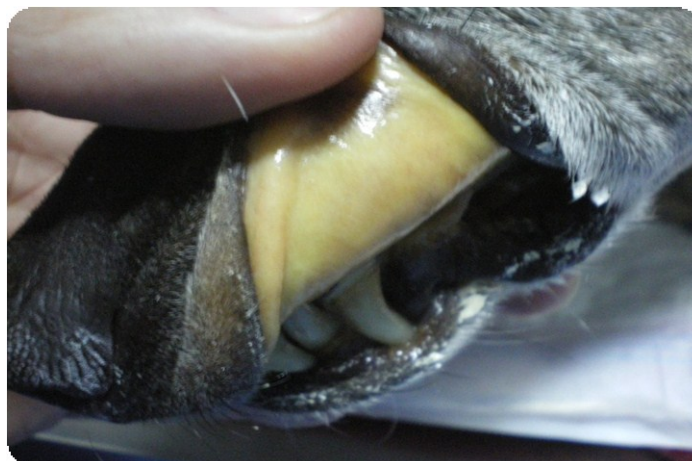
Apesar da relevância evidenciada nas áreas de Medicina Interna e Cirurgia, com esta última a ser valorizada pela experiência na Ortopedia, as actividades assim como o tempo despendido em cada uma dessas mesmas áreas de actuação estiveram sempre dependentes do número de casos que surgiram à consulta ou foram referenciados. No que diz respeito à Medicina Interna, o tempo ocupado deveu-se ao acompanhamento de consultas com uma percentagem elevada de esquemas de vacinação e desparasitação, exames físicos gerais com vista ao *check-up* anual, o registo e movimentação animal. Entre outras, foram acompanhadas consultas referentes à área de Dermatologia, sendo os problemas de pele muitas vezes devidos aos efeitos da presença de parasitas externos (Figura 1), à Endocrinologia com o acompanhamento de diversos casos de *Diabetes mellitus* com especial atenção à estabilização médica e nutricional dos pacientes.

Figura 1 – Imagem esquerda – *Demodex canis* obtido após raspagem em Caniche. Objectiva 40x
Imagem direita – *Cheyletiella yasguri* obtido pelo método de fita-cola em Cocker Spaniel. Objectiva
10x. Fonte: Original



As 220 horas dispensadas em Internamento serviram para acompanhar casos de infecções virais, com predominância para os casos de parvovirose em cães jovens; bacterianas resultando em alterações gastrointestinais em animais de várias idades e parasitárias com relevância para os hemoparasitas tal como *Leishmania* spp. ou *Babesia* spp. (Figura 2). Ainda dentro desta área, foram acompanhados vários casos para tratamentos de emergência e estabilização de epilepsia e *status epilepticus* em cães de raças diversas e de idades compreendidas entre os 2 e os 10 anos.

Figura 2 – Icterícia em canídeo de raça indeterminada por *Babesia canis*. Fonte: Imagem cedida pelo
SOSAnimal - HVV



No que se refere à área de Cirurgia, com a percentagem mais elevada de ocupação do tempo total do estágio, o estagiário teve a oportunidade de estar presente em todas as etapas do

processo cirúrgico particularmente na preparação do paciente, do campo cirúrgico e do material a ser utilizado, na anestesia, como auxiliar do cirurgião e no acompanhamento pós-cirúrgico. As intervenções mais comuns e por ordem foram as ovariectomias, cesarianas, orquiectomias (Figura 3) e ortopedias particularmente as resoluções de fracturas, Não-União do Processo Ancóneo (NUPA) e Ruptura do Ligamento Cruzado Anterior (RLCA).

Figura 3- *Imagem esquerda* – Bolsa escrotal tumefacta e com zona de necrose. *Imagem direita* – Testículos e bolsa escrotal após remoção cirúrgica (Torsão testicular). Fonte: Imagem cedida pelo SOSAnimal - HVV



Na área de Imagiologia, o estagiário teve a possibilidade de auxiliar o médico veterinário responsável através da interpretação dos resultados e da contenção dos pacientes durante a realização de radiografias, ecografias abdominais, ecocardiografias e electrocardiogramas

O estagiário teve sempre a possibilidade de fazer parte de todos os processos nas diferentes áreas de actuação, com o apoio e supervisão dos responsáveis quer da área clínica e cirúrgica como também da área de enfermagem que complementa positivamente as actuações dos médicos veterinários, revelando-se uma mais-valia no mecanismo hospitalar.

2. Actividades no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL

As actividades realizadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL estiveram ligadas sobretudo aos processos de análise das amostras recolhidas. As amostras recolhidas

nos criadores foram posteriormente processadas com um máximo de 48 horas após a sua colheita. Neste laboratório tiveram lugar os exames de flutuação passiva, os esfregaços fecais e sua posterior coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada e ainda os testes rápidos *Speed® Giardia* da BVT, Virbac.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Nota Histórica

Em 1681, o “Pai da Microbiologia” Anton van Leeuwenhoek, observou um protozoário, presente nas suas próprias fezes, ao qual denominou de “animalúnculo”, ficando na história o registo da primeira classificação do que actualmente se refere a *Giardia* spp.

Após esta descoberta, passaram quase 200 anos até Vilém Dušan Lambl (1824-1908), um médico checo, escrever sobre a primeira descrição do flagelado intestinal que baptizou de *Cercomonas intestinalis*. *Giardia* foi um termo introduzido por Kunstler (1883) em homenagem ao referido médico e ao biólogo francês Alfred Mathieu Giard (1846-1908), também ele responsável por uma descrição do protozoário flagelado. A denominação de *Giardia duodenalis*, surgiu com Charles Wardell Stiles (1867-1941), zoologista americano. Em 1915 foi proposto o nome de *Giardia lamblia* resultante da pesquisa de Kofoed e Christiansen com base nas características morfológicas e fazendo uso das descrições de Blanchard e Kunstler. No entanto parecem surgir sempre algumas dúvidas sobre a designação correcta a utilizar pois este organismo, ao longo da história, foi encontrando novas expressões de acordo com a sua localização ou por simples decisão do observador, como é o exemplo de *Megastoma entericum* atribuída por Grassi, *Lambliia intestinalis* por Blanchard ou até mesmo a decisão de Davaine de o denominar *Hexamitus duodenalis* (Dobell, 1919). Desde a descoberta de *Giardia* spp. ao reconhecimento da crescente importância zoonótica nos dias de hoje passaram mais de três séculos, com estudos a revelarem prevalências elevadas em animais de companhia, de produção e até em mamíferos silvestres (Bednarska *et al.* 2006).

2. Taxonomia

A classificação do género *Giardia* tem sido objecto de várias alterações ao longo do tempo, com os responsáveis das designações a serem deparados com inúmeros factores que a têm levado a sofrer tantos rearranjos e denominações.

As primeiras classificações baseadas na morfologia entendiam que o género *Giardia* deveria ser incluído no reino Protista que compreende 11 Filos e 65 Classes segundo Cavalier-Smith (2003), ou melhor, no táxon Protista uma vez que este passou a ser assim considerado por entender tratar-se de um grupo parafilético do qual fazem parte vários descendentes de um ancestral comum, porém não estando todos presentes. Para além deste reino este género pertencia ao Filo Sarcomastigophora, Sub-Filo Mastigophora (flagelados), Classe Zoomastigophorea, Ordem Diplomonadida e Família Hexamitidae (Plutzer *et al.* 2010)

Com a possibilidade de basear a sistemática em métodos científicos mais avançados com acesso a informação estrutural, morfológica, bioquímica e genética foi definido que *Giardia* pertence ao Sub-Reino Sarcomastigota, Infra-Reino Excavata (estruturas ciliares dos membros com sulco ventral), Filo Metamonada, Sub-Filo Trichozoa, Superclasse Eopharyngia, Classe Treponomadae, Sub-Classe Diplozoa, Ordem Giardiida e Família Giardiidae (Cavalier-Smith, 2003).

2.1. Género *Giardia*

O consenso para a definição do número de espécies pertencentes ao género *Giardia* não tem sido fácil, assim como o esclarecimento para a correcta denominação de cada um deles. Em 1951, Filice definiu que se deveriam considerar 3 espécies das quais *G. duodenalis*, encontrada em várias espécies de mamíferos onde se incluem carnívoros, humanos e outros primatas, *G. agilis* em anfíbios e *G. muris* em roedores. É reconhecido actualmente que este género engloba seis espécies (Tabela 1), sendo que a concepção inicial de que *G. lamblia* apenas se encontraria em humanos é errada, passando a ser descrita como sinónimo de *G. intestinalis* ou *G. duodenalis* sendo caracterizada por um complexo de espécies que engloba sete grupos ou *assemblages* com poucas diferenças morfológicas mas que se dividem com base na análise genética (Cacciò & Ryan, 2008). As *assemblages* A e B são as que apresentam uma maior gama de hospedeiros susceptíveis, em particular humanos e outros primatas para além de animais domésticos e selvagens, o que as destaca devido à importância do seu potencial zoonótico. No que se refere aos animais de companhia, sobretudo as *assemblages* C e D foram encontradas em cães infectados e a assemblage F em gatos (Tangtrongsup & Scorza, 2010).

Tabela 1 – Espécies de *Giardia* e seus hospedeiros. Adaptado de Tangtrongsup & Scorza, 2010

Espécies/Assemblages	Nomenclatura Proposta	Hospedeiros susceptíveis
<i>G. duodenalis</i>		
<i>Assemblage A</i>	<i>G. duodenalis</i>	Humanos e outros primatas, cães, gatos, gado, roedores e animais selvagens
<i>Assemblage B</i>	<i>G. enterica</i>	Humanos e primatas, cães e algumas espécies selvagens
<i>Assemblage C e D</i>	<i>G. canis</i>	Cães e outros canídeos
<i>Assemblage E</i>	<i>G. bovis</i>	Bovinos e outros ungulados domésticos
<i>Assemblage F</i>	<i>G. felis</i>	Gatos
<i>Assemblage G</i>	<i>G. simondi</i>	Ratos
<i>G. agilis</i>	<i>G. agilis</i>	Anfíbios
<i>G. muris</i>	<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. ardeae</i>	<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. microti</i>	<i>G. microti</i>	Roedores

As *assemblages* A e B, por se tratarem de isolados obtidos em humanos, foram as primeiras a ser reconhecidas e podem ainda ser denominadas, respectivamente, como genótipo Polaco e Belga segundo Homan *et al* (1992), ou ainda como grupos I/II e III/IV com base no trabalho de Andrews *et al* (1998). Apesar das semelhanças no que toca a hospedeiros susceptíveis, as diferenças genómicas entre as *assemblages* A e B, com destaque para os genes envolvidos na sobrevivência do parasita durante a infecção, podem explicar algumas das diferenças biológicas e clínicas observadas, o que sugere a possibilidade de estas se tratarem de duas espécies distintas (Franzén, et al., 2009).

3. Biologia Celular

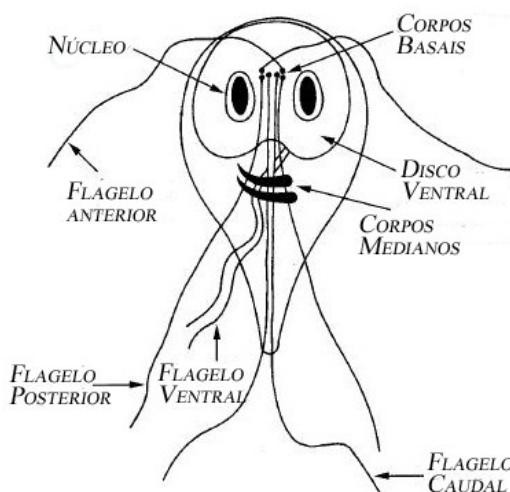
Giardia e em particular *G. duodenalis*, é um típico organismo eucariota por apresentar um núcleo distinto e uma membrana nuclear, citoesqueleto e sistema endomembranar, mas carece de outros organelos que são praticamente universais nos eucariotas como é o caso dos peroxissomas e nucléolos, sendo ainda anaeróbia e não possui mitocôndria ou qualquer outro dos componentes da fosforilação oxidativa (Adam, 2001). Apesar de não possuir mitocôndria, tal não implica que este organismo seja um ancestral dos eucariotas e Archaeobacterias que por processos de endossimbiose viriam a adquirir estes organelos numa fase evolutiva mais avançada, uma vez que com a descodificação do genoma, tal como refere Adam (2001),

foram reconhecidos os genes mitocondriais presentes nas espécies de *Giardia*, levando o autor a sugerir que estes protistas amitocondriais perderam o organelo mais tarde.

3.1. Morfologia

Os trofozoítos de *Giardia* spp possuem uma estrutura característica em forma de lágrima, com algumas diferenças entre as espécies encontradas nos diferentes hospedeiros. Tomando como base *G. duodenalis*, os trofozoítos apresentam forma de lágrima ou de pêra com um comprimento de 12 a 15 μm e com 5 a 9 μm de largura, aproximadamente. O citoesqueleto deste parasita inclui um corpo mediano, 4 pares de flagelos (anterior, posterior, caudal e ventral) e um disco ventral (Figura 4). Os 2 núcleos presentes são simétricos em relação ao eixo central não apresentando nucléolo e no citoplasma estão presentes os vacúolos lisossomais (Figura 5) de acordo com Adam (2001).

Figura 4 - Esquema de trofozoíto de *G. duodenalis*. Adaptado de Faubert (2000)



Os corpos basais presentes na zona anterior do sulco ou eixo central são os locais de onde se originam os 4 pares de flagelos que conferem a mobilidade ao trofozoíto. No que se refere ao corpo mediano, encontra-se na linha média e dorsal aos flagelos caudais sendo constituído por microtúbulos num feixe justo, exclusivo no género *Giardia*, usado para ajudar na definição das espécies existentes com base nas características morfológicas, usando como referência o corpo mediano de *G. lamblia*, em forma de gancho de martelo (Tabela 2) de acordo com Adam (2001). Apesar de ser importante neste aspecto de classificação, a função do corpo mediano é ainda desconhecida (Ankarklev *et al*, 2010).

Figura 5 – Corte transversal de trofozoíto. Realce para a presença dos núcleos (N), flagelos (F), vacúolos (V) e retículo endoplasmático (ER). Fonte: Adam (2001)

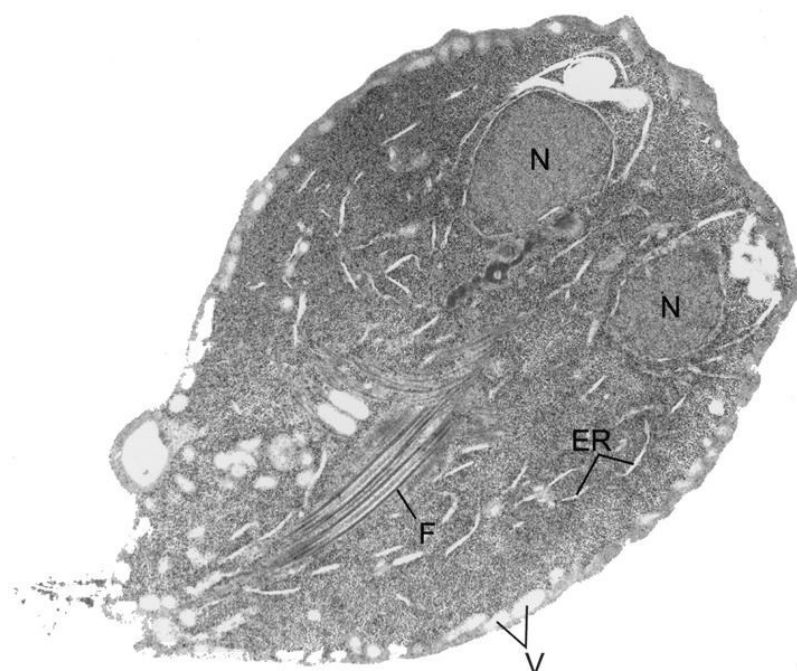


Tabela 2 – Espécies de *Giardia* e características morfológicas. Adaptado de Adam (2001)

Espécie	Morfologia por	
	M. O.	M. E.
<i>G. agilis</i>	Longa e esguia; corpos medianos em forma de lágrima	-
<i>G. muris</i>	Curta e arredondada; Pequeno corpo mediano redondo	-
<i>G. duodenalis</i>	Em forma de pêra; 1 ou 2 corpos medianos em forma de garra, transversos	-
<i>G. ardeae</i>	Idêntica a <i>G. duodenalis</i>	Disco ventral e flagelo caudal idênticos a <i>G. muris</i>
<i>G. psittaci</i>	Idêntica a <i>G. duodenalis</i>	Rebordo ventrolateral incompleto, sem sulco marginal
<i>G. microti</i>	Idêntica a <i>G. duodenalis</i>	Quistos possuem 2 trofozoítos com discos ventrais maduros

O disco ventral (Figura 6) é uma estrutura única apenas reconhecida dentro do género *Giardia*. É uma estrutura em forma de cúpula capaz de modular a sua concavidade aos locais de acoplamento e composta por uma matriz de microtúbulos (Elmendorf, Dawson, & McCafrey, 2003), representando uma grande proporção das proteínas encontradas neste organelo encontram-se as giardinas, importantes no processo de acoplamento do parasita ao

hospedeiro. São exclusivas do género *Giardia* o que as torna de interesse principal no estudo da resposta imune do hospedeiro ao parasita. A α 1-giardina, α 2-giardina e γ -giardina são antigénios de superfície e provavelmente os primeiros a serem detectados pelo sistema imunitário do hospedeiro após ligação à mucosa (Faubert, 2000).

Figura 6 – Vista ventral de trofozoíto de *Giardia* por foto electrónica de varrimento com coloração digital. Fonte: Erlandsen (2005b)

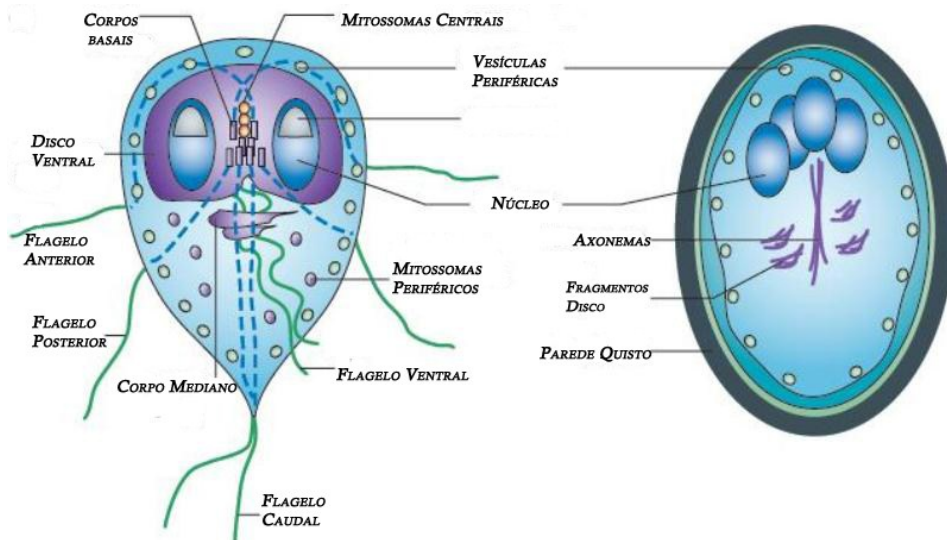


Os quistos de *Giardia* spp são estruturas ovais sem motilidade, com 4 núcleos tetraplóides, um comprimento aproximado de 8-12 μ m e uma largura de 7-10 μ m. A parede do quisto tem uma espessura entre os 0,3 e os 0,5 μ m é composta por uma camada externa filamentosa, cujo diâmetro dos próprios filamentos varia entre os 7 e os 20 nm, enquanto a camada mais interna é membranosa com 2 membranas (Adam, 2001).

Em relação à camada externa do quisto é reconhecida a presença de várias proteínas estruturais sendo composta predominantemente por N-acetilgalactosamina, um açúcar, existindo no entanto uma certa discrepância no reconhecimento do número de proteínas que constituem a parede com Adam (2001) a referir a presença de 4 proteínas mas no seu trabalho Ankarklev *et al* (2010) apenas salientam 3 proteínas (CWP1, CWP2 e CWP3). Sendo a forma mais estável do ciclo de vida no ambiente, o quisto de *Giardia* spp apresenta uma taxa metabólica de apenas 10 a 20% daquela encontrada no trofozoíto (Paget *et al*, 1989).

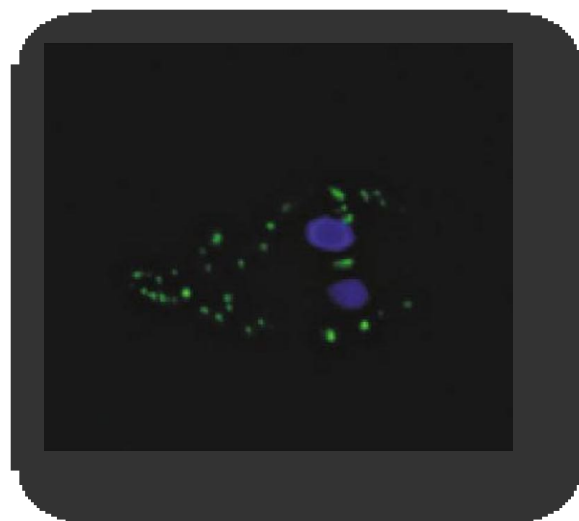
Figura 7 – Representação esquemática comparativa entre trofozoíto e quisto e suas estruturas chave.

Fonte: Ankarklev *et al* (2010)



Os mitossomas estão presentes nas duas formas do ciclo biológico, quisto e trofozoíto. São formas minimizadas de mitocôndria que perderam todo o genoma assim como a maioria das vias mitocondriais incluindo a respiração, o ciclo do ácido cítrico e a síntese de ATP. São organelos ovóides com um tamanho inferior a $0,2\mu\text{m}$, com um número variável entre 25 a 100 por célula. Existem 2 tipos de mitossomas de acordo com a sua distribuição, centrais e periféricos (Figura 7 e 8). Até à data a única via metabólica contida e reconhecida aos mitossomas de *G. intestinalis* é a formação de centros de ferro-enxofre (FeS clusters) (Tachezy & Dolezal, 2011).

Figura 8 – Mitossomas de *G. intestinalis* em marcação imunofluorescente. Fonte: Tachezy & Dolezal (2011)



3.2. Diferenciação celular

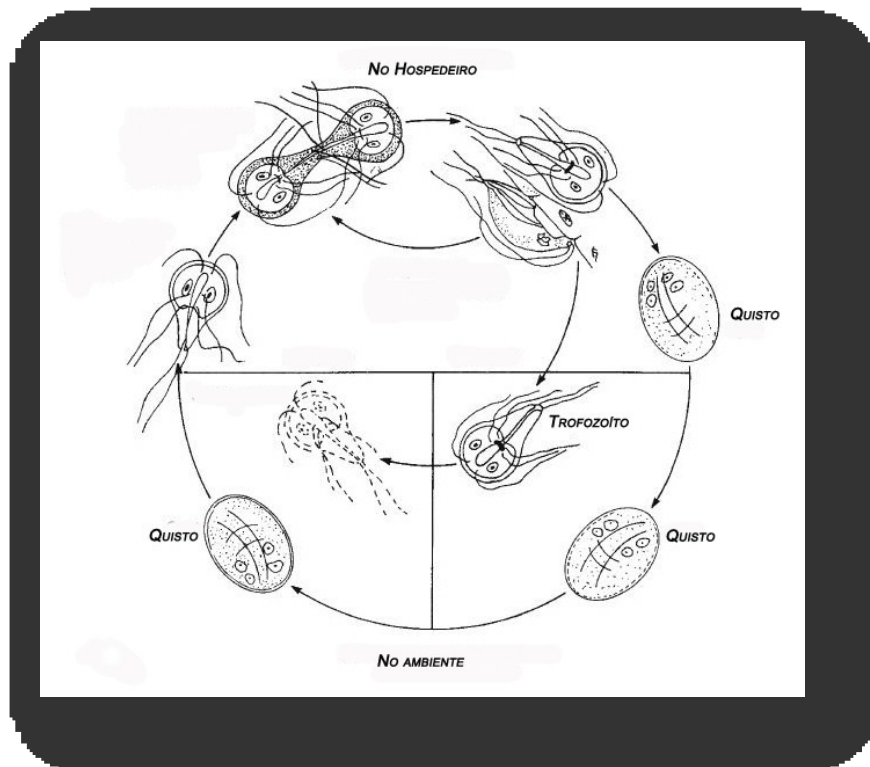
3.2.1. Transformação quisto/trofozoíto

A passagem de trofozoíto a quisto após alteração das condições no hospedeiro é uma fase importante para a manutenção do parasita e a capacidade deste sobreviver no meio exterior até infectar um novo hospedeiro. A formação do quisto é marcada por uma expansão do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) e Complexo de Golgi necessários para uma rápida síntese e secreção das 2 principais proteínas da parede, CWP1 e CWP2. Os flagelos e o disco ventral tornam-se estruturas sem relevância sendo separadas em fragmentos que são armazenados no citoplasma. (Elmendorf, Dawson, & McCafrey, 2003). Na fase final do enquistamento, o processo de transformação do trofozoíto móvel no quisto infectante e sem motilidade, ocorre divisão nuclear dando origem ao quisto maduro com 4 núcleos (Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist, Ringqvist, Troell, & Svard, 2010). Os trofozoítos presentes no lúmen intestinal monitorizam e respondem constantemente ao ambiente que os rodeia, sendo que a exposição a pH alcalino e aumento dos sais biliares desencadeiam o processo de enquistamento (Lauwaet, Davids, Reiner, & Gillin, 2007). O processo de desenquistamento, passagem de quisto a trofozoíto, ocorre na zona proximal do intestino delgado, seguida da passagem através do ambiente ácido do estômago. Após exposição a estas condições o processo é rápido. O trofozoíto que emerge, apresenta 4 núcleos e 8 flagelos, sofre citocinese resultando deste processo 2 trofozoítos (Adam, 2001).

4. Ciclo biológico

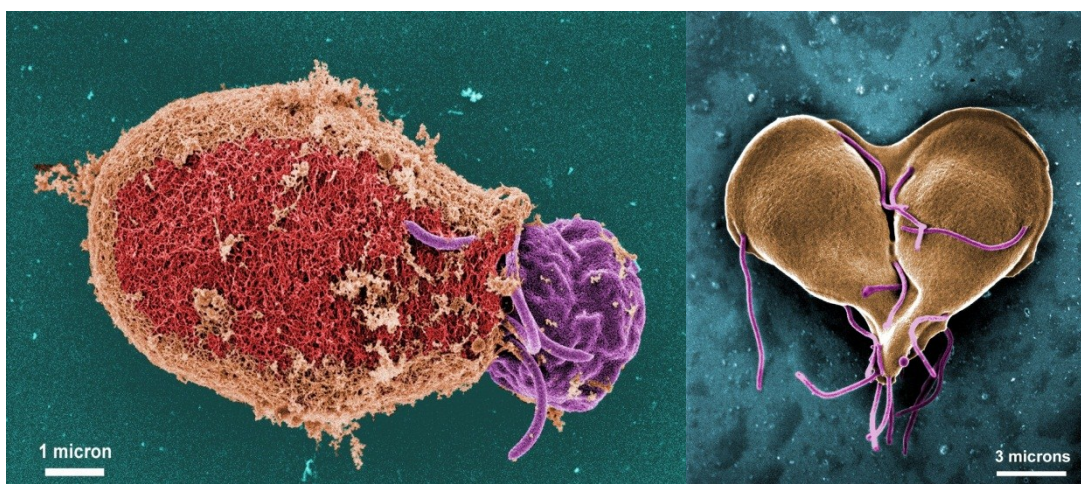
Como já foi referido *Giardia* spp. existe em duas formas com interesse para o seu ciclo biológico (Figura 9). O trofozoíto que se multiplica, alimenta e parasita o hospedeiro e o quisto, forma infectante e resistente no ambiente. A infecção é iniciada após a ingestão dos quistos infectantes e maduros. O desenquistamento ocorre no intestino delgado e um trofozoíto emerge do quisto, sofre rápida divisão citoplasmática, mas não nuclear, formando 2 trofozoítos binucleados. Os trofozoítos acoplam-se à superfície dos enterócitos do jejuno e duodeno e após ligação sofrem outra divisão por fissão binária (Figura 10) (Smith & Paget, 2007). Apesar de a reprodução ser considerada assexuada Meloni *et al* (1989) referem que um estado diplóide no ciclo de vida abre a possibilidade de existência de reprodução sexuada.

Figura 9 – Ciclo biológico de *Giardia* spp. Adaptado de Smith & Paget (2007)



A formação de quistos ocorre à medida que o parasita transita em direcção ao cólon, apesar de ambos trofozoítos e quistos poderem ser encontradas nas fezes, normalmente 5-7 dias pós-infecção. O período pré patente (ppp) de *Giardia* spp. em cães e gatos é 5 a 16 dias e a excreção dos quistos é muitas vezes intermitente (Thompson, Palmer, & O'Handley, 2008).

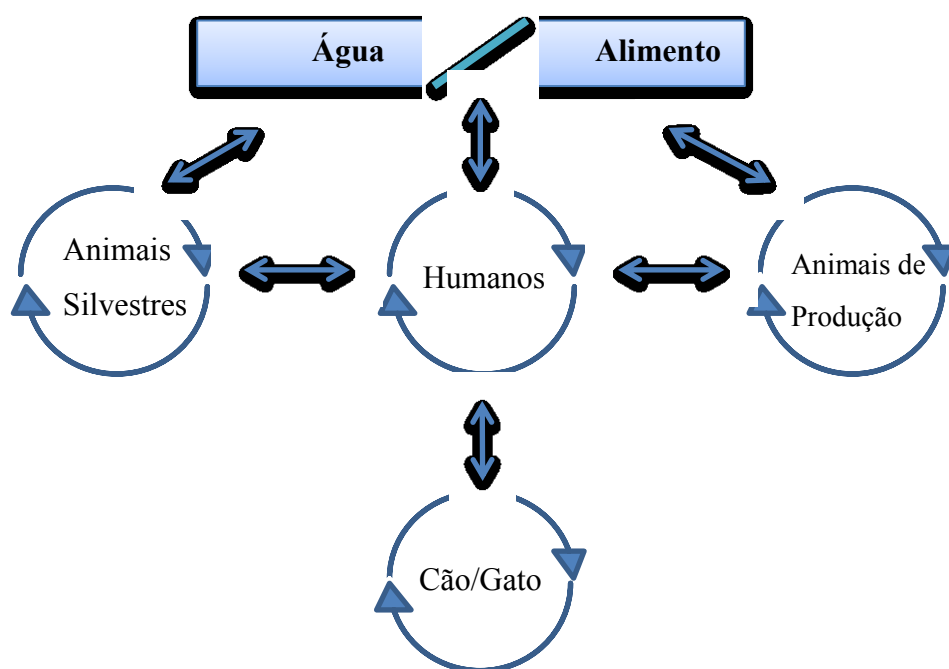
Figura 10 – Desenquistamento (esq) e fissão binária (dir). Micrografia electrónica de varrimento colorida digitalmente. Fonte: (Erlandsen, 2005a)



5. Epidemiologia

As vias de transmissão ambientais incluem todos os meios ou veículos que contêm formas infectantes suficientes sendo os mais comuns a água e alimentos (Smith, Cacciò, Cook, Nichols, & Tait, 2007). A transmissão de *Giardia* pode ocorrer através de qualquer mecanismo pelo qual material contaminado com fezes contendo quistos infectantes de seres humanos ou animais possa ser ingerido por um hospedeiro susceptível (Smith & Paget, 2007). Os quistos de *Giardia* são transmitidos por via fecal-oral, directa ou indirectamente e ao contrário das coccídeas e helmintes não precisam de um período de maturação, pois imediatamente após excreção são capazes de infectar um novo hospedeiro (Plutzer, Ongerth, & Karanisc, 2010). Um pequeno número de quistos (10-100) pode iniciar a infecção (Ballweber, Xiao, Bowman, Kahn, & Cama, 2010). Os potenciais mecanismos de transmissão incluem pessoa a pessoa, animal a animal, animal a pessoa ou vice-versa (zoonótico), através da água, quer pelo consumo ou através de actividades de recreio, pelos alimentos e ainda por contacto sexual em grupos de risco (Plutzer, Ongerth, & Karanisc, 2010). As espécies de *Giardia* capazes de infectar vários hospedeiros, como é o caso de *G. duodenalis*, são mantidas numa variedade de ciclos de transmissão (Figura 11) que podem ser sustentados independentemente, sem interacção entre os mesmos (Hunter & Thompson, 2005). No entanto devemos considerar a forma como estes ciclos interagem entre si e tentar determinar a frequência de transmissão dos genótipos zoonóticos (Thompson, 2004).

Figura 11 – Diagrama dos ciclos de transmissão de *Giardia*. Adaptado: (Hunter & Thompson, 2005)



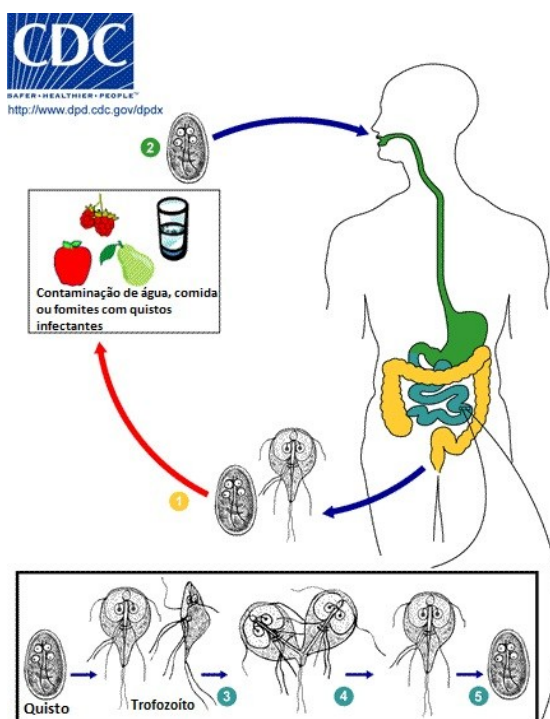
Os estudos epidemiológicos demonstram que as infecções por *Giardia* ocorrem mais frequentemente em canis ou estabelecimentos de criação intensiva que em cães mantidos isoladamente, como animais de companhia ou mesmo de pequenos criadores. Assim, mesmo as taxas de prevalência também variam de acordo com a composição da população canina em estudo, com a literatura a estimar taxas de infecção aproximadas de 10% para cães bem cuidados, 36 a 50% em cachorros e valores de até 100% em canis de criação. Os cães criados em canil são afectados, maioritariamente, por parasitas de ciclo de vida directo, quer por transmissão directa quer através de fomites. Isto acontece principalmente pelas fracas condições higiénicas presentes no canil, com a infecção a originar-se na ingestão de quistos durante a alimentação ou na água de bebida contaminadas por fezes de animais infectados, ou até pelo contacto directo com a pelagem contaminada desses mesmos animais (Papini, Gorini, Spaziani, & Cardini, 2005).

5.1. Potencial e risco zoonótico

G. duodenalis é o parasita gastrointestinal mais encontrado em todo o mundo. O seu maior impacto clínico está ligado a crianças nos seus primeiros anos de vida (Eligio-Garcia, Cortes-Campos, & Jimenez-Cardoso, 2005). A giardiose é também reconhecida mundialmente como a doença dos viajantes em particular nos países em desenvolvimento (Wolfe, 1992). É considerada a causa mais comum de surtos associados a água para consumo humano, com uma prevalência de 20 a 30% nos países em desenvolvimento, tendo sido sugerida uma relação com o atraso no crescimento em crianças (Júlio, et al., 2012). Contribui anualmente para 280 milhões de infecções sintomáticas em humanos e foi incluída como parte da “Neglected Disease Initiative” da OMS desde 2004 (Ankarklev, Jerlstrom-Hultqvist, Ringqvist, Troell, & Svard, 2010; Savioli, Smith, & Thompson, 2006). A giardiose trata-se de uma doença de notificação obrigatória em alguns países industrializados como é o caso do Canadá, Japão, Estados Unidos da América e Nova Zelândia (Ballweber, Xiao, Bowman, Kahn, & Cama, 2010). Na Europa no entanto, não é o caso. A notificação na Bélgica e em Espanha é voluntária e só é necessária no Reino Unido e no País de Gales se se relacionar com intoxicações alimentares. O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que ocorrem 2 milhões de casos por ano nos Estados Unidos da América, com o maior números de casos em crianças até aos 9 anos e em adultos entre os 35 e os 44 anos de idade (Figura 12). Estes casos surgem em regiões mais a norte do país e com o pico no início do verão até ao início do outono (Ballweber, Xiao, Bowman, Kahn, & Cama, 2010).

Figura 12 – Ciclo de vida de *Giardia* spp. e possíveis fontes de contaminação para humanos.

Adaptado: (DPDx, 2010)



A giardiose humana apresenta-se com uma diversidade de manifestações clínicas, que variam de casos assintomáticos a agudos, intermitentes ou crônicos de diarreia não sanguinolenta. Outros sintomas podem incluir câibras, náuseas, vômitos, esteatorreia, anorexia e perda de peso, sem que haja presença de sangue nas fezes (Ballweber, Xiao, Bowman, Kahn, & Cama, 2010).

A enterite por *Giardia* pode ainda ser relacionada com a Síndrome de Fadiga Crônica (SFC), como revela o trabalho de Naess *et al* (2012), onde 60% dos 96 pacientes com fadiga pós-infecciosa de longa duração e com confirmação laboratorial de giardiose, foram diagnosticados com SFC.

O potencial risco de saúde para os humanos de parasitas gastrointestinais de cães e gatos mantém-se como um problema significativo em todo o mundo. Estudos recentes nos Estados Unidos e na Austrália demonstraram valores de infecção por *Giardia* superiores aos esperados (Carlin, Bowman, & Scarlett, 2006).

Para além de ser comumente descrito em humanos, este parasita é também frequentemente encontrado em animais domésticos, especialmente em animais de pecuária, cães, gatos e numerosas espécies de mamíferos silvestres e aves (Thompson, 2004b). No caso particular, os cães podem albergar espécies de *Giardia* potencialmente infectantes para os humanos em especial a indivíduos imunocomprometidos (Papini, Gorini, Spaziani, & Cardini, 2005).

Foram ainda encontrados isolados de diferentes espécies de *Giardia* em peixes, como pode ser visto no trabalho de Yang *et al* (2010) onde foi estudada a prevalência dos genótipos zoonóticos em alevins de cultura, de água doce e salgada.

Cães e gatos têm sido mantidos na linha da frente como fontes regulares de infecção humana com *G. duodenalis* e como portadores deste agente zoonótico (Bowman & Lucio-Forster, 2010). No entanto e apesar da significância clínica de *Giardia* em cães e gatos parecer ser mínima, a importância em saúde pública da infecção nesses animais tem sido objecto de debate e é ainda uma questão que levanta alguma incerteza entre os veterinários (Thompson, 2004a). De um ponto de vista de saúde pública, os maiores e potenciais riscos advêm dos genótipos das *assemblages* A e talvez numa menor dimensão das *assemblages* B. A epidemiologia molecular já demonstrou inequivocamente que as espécies de *Giardia* que infectam humanos também podem ser surgir em várias outras espécies de mamíferos. (Thompson, Hopkins, & Homan, 2000). Podemos tomar como exemplo o facto de ser comum a presença tanto da assemblage D (específica para o cão) como da assemblage A, nos cães em ambiente urbano e doméstico na Austrália, sendo assim de considerar a possibilidade da transmissão zoonótica da assemblage A entre os animais e os seus proprietários. A possibilidade de transmissão é salientada por ser mais comum a infecção nos cães que vivem em lares com mais do que um animal em relação aos que possuem apenas um animal. Apesar destas evidências, os estudos epidemiológicos moleculares em locais endémicos, onde a frequência de transmissão de genótipos zoonóticos e não zoonóticos é elevada, providenciará informação útil no que respeita à frequência de transmissão zoonótica (Thompson, 2004a).

Considerando as *assemblages* A e B as de maior potencial zoonótico estão descritos vários casos e estudos onde se podem encontrar evidências da presença destes genótipos em diferentes espécies animais. Nos animais de produção e particularmente em vacas de leite e de carne, Mendonça *et al* (2007) referem a presença de *assemblages* A e B na zona norte de Portugal, salientando que a assemblage E é no entanto a mais prevalente. Os animais de companhia como o cão e o gato porém, mostram-se capazes de albergar as *assemblages* A e B para além das específicas da sua espécie como é o caso das C e D para o cão e F para o gato. Poucos estudos até agora compararam os isolados de *Giardia* de humanos e animais que partilham o mesmo local. Como exemplo de contraste os estudos nas comunidades aborígenes da Austrália demonstraram que o genótipo específico do cão (assemblage C e D) predominava nos animais infectados, enquanto nas regiões remotas de Assam, Índia, as infecções de humanos e animais vieram a demonstrar a presença dos genótipos zoonóticos nos cães infectados (Thompson, 2004a). No entanto, muitos estudos enaltecem o papel chave do

saneamento e higiene pessoal como o maior factor de risco para giardiose nos países em desenvolvimento sugerindo ainda que a transmissão zoonótica tem um papel, quando muito, menor (Hunter & Thompson, 2005). No entanto o trabalho de Eligio-Garcia *et al* (2005) demonstra o isolamento da assemblage A de *G. duodenalis* em fezes de humanos e de cão do mesmo ambiente, através de resultados genotípicos.

Existem no entanto algumas discrepâncias sobre a relevância da transmissão zoonótica, com Thompson (2004b) a referir que o potencial zoonótico de *Giardia* não está mais em causa mas a informação relativa à frequência da transmissão é escassa., E em contraposição Ballweber *et al* (2010) salientam que o papel do cão e gato como fonte de giardiose humana continua por resolver, apesar de alguns estudos com limitado número de casos providenciarem pouca evidência da transmissão zoonótica, o potencial papel do cão e gato, provavelmente menor, não pode ser excluído de forma conclusiva.

6. Sinais clínicos

A infecção por *Giardia* é comum mas o organismo nem sempre é um agente patogénico primário efectivo, porque muitos dos cães e gatos infectados são portadores subclínicos (Tangtrongsup & Scorza, 2010). A maioria das infecções por *Giardia* nos cães são assintomáticas, porém alguns dos animais infectados podem sofrer de diarreia aguda ou crónica, perda de peso, diminuição no ganho de peso apesar de manterem um apetite normal e ainda, mas menos comum, vómitos e letargia (Hamnes, Gjerde, & Robertson, 2007). A diarreia pode surgir logo aos 5 dias pós-infecção e o aparecimento de quistos após uma ou duas semanas (Bowman, 2009a). A perda de peso pode ocorrer nos casos de má absorção crónica, podendo o animal parecer aquém do seu desenvolvimento normal (Tangtrongsup & Scorza, 2010). Quando a diarreia está presente, esta é pastosa a líquida, frequentemente com muco e um odor forte, e esteatorreia também pode ocorrer. É normalmente auto-limitante em animais imunocompetentes (Tangtrongsup & Scorza, 2010). Os casos crónicos são caracterizados por episódios breves ou persistentes de diarreia recorrente, com a possibilidade da cronicidade desta infecção estar ligada ao fenómeno de variação antigénica do parasita (Muller & von Allmen, 2005). Geralmente controlada por um sistema imunitário saudável pode ser fatal em animais com uma imunidade comprometida (Rosa et al., 2007).

7. Patogenia

Vários protozoários são sujeitos a variação antigénica, essencialmente um mecanismo de evasão da resposta humoral dos seus hospedeiros vertebrados. Nas espécies de *Giardia* tal é

atingido através dos mecanismos de expressão dos genes que codificam as VSP, que são proteínas de superfície (Ankarklev *et al*, 2010). As infecções por *Giardia* spp. em ratinhos mostraram danos na superfície da mucosa do intestino delgado por atrofia das criptas e das microvilosidades e ainda alteração da actividade de certas enzimas digestivas como as proteases, lipases e dissacaridases (Roxstrom-Lindquist, Palm, Reiner, Ringqvist, & Svard, 2006). No entanto os sintomas associados a giardiose podem surgir sem que haja atrofia das vilosidades ou qualquer outro sinal de dano da mucosa (Roxstrom-Lindquist *et al*, 2006; Buret, 2008) Os factores associados com a progressão da doença incluem o estado clínico e nutricional do hospedeiro, idade e resposta imunitária.

Poucos factores de virulência foram identificados até à data mas os principais incluem o disco ventral, os flagelos e as VSP (Tabela 3) (Ankarklev *et al*, 2010). *Giardia* spp. têm de ser capazes de se acoplar ou ligar às células epiteliais para manter a infecção no intestino delgado do hospedeiro e assim prevenir a sua eliminação pelos movimentos peristálticos. Aqui se mostra a importância do disco ventral que vai permitir que o parasita se liberte e movimente (Elmendorf, Dawson, & McCafrey, 2003).

Tabela 3 – Principais factores de virulência de *Giardia* spp. Adaptado de Ankarklev *et al* (2010).

Função	Factor de virulência
Ligação	O disco ventral e as lectinas permitem a ligação e colonização do endotélio intestinal
Evasão dos factores naturais do lume intestinal	Motilidade (flagelos) permite a realocização para novo endotélio durante a colonização
Variação antigénica	Alteração das VSP na superfície do trofozoíto evita a acção das IgA
Alteração das defesas inatas do hospedeiro	Libertação de produtos reguladores da diminuição da produção de óxido nítrico pelo epitélio
Modificações anti-inflamatórias	Papel anti-inflamatório de produtos ainda desconhecidos dos trofozoítos
Sobrevivência no ácido estomacal e no ambiente externo	Diferenciação em quistos

Apesar do trofozoíto interferir com a integridade do epitélio do intestino delgado os mecanismos patogénicos específicos ainda não foram totalmente esclarecidos, nem o facto de alguns indivíduos permanecerem assintomáticos e outros mostrarem sinais graves da doença (Wolfe, 1992). No entanto o trofozoíto é encontrado na superfície do epitélio intestinal e como tal é pouco provável que a patogénese seja consequência de danos directos na célula. Os

mecanismos de patogenia propostos incluem produção de toxinas, disrupção da flora microbiana normal, indução de alterações inflamatórias intestinais, inibição da função enzimática normal, danos nas microvilosidades, indução de alterações da motilidade e da apoptose celular, tendo como resultado a diarreia por má absorção e hipersecreção intestinais (Tangtrongsup & Scorza, 2010). Através de modelos *in vivo* e *in vitro* foi estabelecido que os parasitas do género *Giardia* aumentam a permeabilidade intestinal sugerindo os dados disponíveis que tal é resultado da apoptose celular induzida pelo parasita, sendo também reconhecido que esta alteração estará na origem da má absorção de glucose, sódio e água, concorrendo todos estes factores para a síndrome diarreica associada a este protozoário (Buret, 2008).

A maioria dos autores reconhece a importância do sistema imunitário e de uma resposta adequada do mesmo no mecanismo que levará à eliminação da infecção, de uma possível reinfeção e da dimensão dos danos causados pelo parasita. Faubert (2000) refere essa mesma importância dos linfócitos T na eliminação da infecção primária e na subsequente reinfeção. Os danos da bordadura em escova e das deficiências na actividade da dissacaridase são mediados por células T CD8+ e não apenas um resultado do acoplamento dos trofozoítos e dos factores de virulência, uma vez que tais alterações não são observáveis em hospedeiros privados de linfócitos T funcionais (Buret, 2008; Scott, Yu, & Buret, 2004). No entanto Scott, Meddings, Kirk, Lees-Miller, & Buret (2002) especulam que a perda da função de barreira epitelial exercida pelo intestino delgado na giardiose é induzida independentemente da presença de linfócitos T, demonstrando que o aumento da permeabilidade intestinal pode ser detectado tanto em animais atímicos como em animais imunocompetentes.

8. Prevalência

As taxas de prevalência para infecção por *Giardia* em cães (Tabela 4) e mesmo em gatos variam de acordo com diversos factores nos quais se incluem a população em estudo, a área e as condições existentes no local onde os animais estão presentes, o método de diagnóstico usado e as condições higio-sanitárias dos animais. A prevalência de giardiose nos cães pode ser de 10% para cães de particulares e bem tratados, pode atingir os 50% em cachorros e eventualmente chegar aos 100% em animais pertencentes a abrigos ou canis (Rosa, et al., 2007). De destacar o trabalho efectuado em Portugal por Lebre (2011), em que mais de 60% (n= 54) das amostras fecais de cães foram positivas para este protozoário.

Tabela 4 – Prevalência de *Giardia* em cães de acordo com a sua origem, na Europa

País/Região	Origem	Amostra	Prevalência (%)	Referência
Alemanha	Dono	3175	23.75%	Epe <i>et al</i> , 2010
Bélgica	Canil	357	43.9%	Claerebout <i>et al</i> , 2009
Eslováquia	Vários	752	1.6%	Szabová <i>et al</i> , 2007
Espanha	Dono	1757	25.1%	Epe <i>et al</i> , 2010
França/Paris	Dono	93	12.9%	Beugnet <i>et al</i> , 2000
Holanda	Dono	727	24.62%	Epe <i>et al</i> , 2010
Itália/Roma	Dono	183	55.2%	Papini <i>et al</i> , 2004
Noruega	Dono/Canil	290	20.7%	Hamnes <i>et al</i> 2007
Polónia	Cães de trenó	108	28%	Bajer <i>et al</i> , 2011
Portugal/Lisboa	Canil	54	61.1%	Lebre, 2011
Reino Unido/Londres	Canil	878	21%	Upjohn <i>et al</i> , 2010

Vários estudos têm sido realizados a nível mundial para a prevalência de *Giardia* (Anexo 2). Os animais jovens apresentam taxas de incidência superiores tomando como exemplo um estudo efectuado nos Estados Unidos da América onde a prevalência média situou-se nos 4,0% e a taxa para os animais com idades inferiores a 6 meses atingia os 13,1% e valores inferiores a 1% em animais com mais de 3 anos de idade. Parece não existir diferença significativa nas taxas de prevalência dos animais que apresentam diarreia ou outro sintoma dos animais assintomáticos. Quando comparados os parâmetros, o que mais evidencia diferenças é a origem ou o ambiente em que o animal se insere com a prevalência a mostrar-se superior nos animais de canil ou abrigos em relação aos animais de proprietários privados (Tangtrongsup & Scorza, 2010). No que se refere exclusivamente a canis de criação no trabalho realizado por Itoh *et al* (2005) em 14 diferentes canis no Japão, foi observada a presença de *Giardia* em todos sem excepção, com as prevalências a variarem entre 6,7% e 59,3%.

9. Diagnóstico

A escolha de um método de diagnóstico eficaz tem sido algo bastante debatido ao longo dos anos sobretudo devido ao comportamento específico do parasita durante o seu ciclo biológico. A intermitência na excreção dos quistos é uma das principais barreiras no correcto diagnóstico

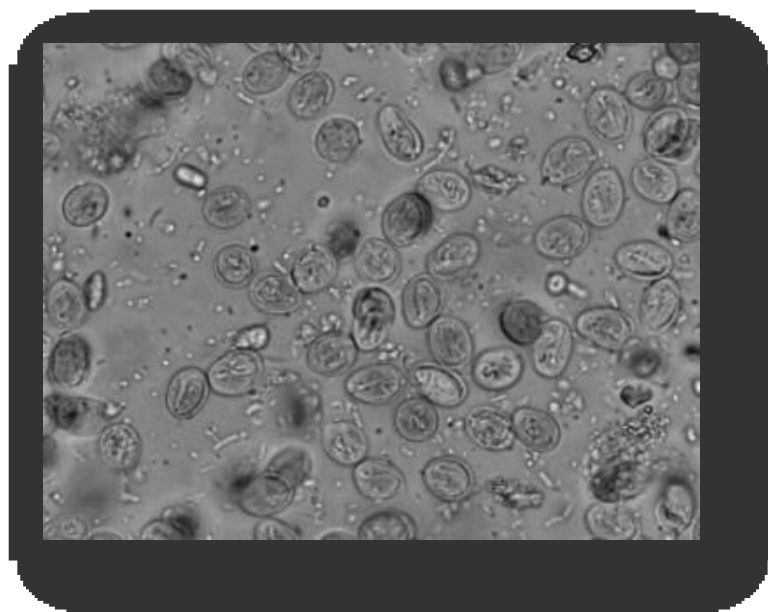
de giardiose, para além da sua reduzida dimensão, associada muitas vezes à falta de experiência necessária para uma correcta identificação destes parasitas por parte dos veterinários ou outros operadores (Epe, Rehker, Shnieder, Lorentzen, & Kreienbrock, 2010). Se o animal tiver sido sujeito a medicação prévia ou eventualmente submetido a alguma intervenção tais acções podem levar a alterações na morfologia e/ou na quantidade de parasitas presentes, tornando mais árdua a tarefa de os identificar (Wolfe, 1992). Os cães jovens excretam em média 2000 quistos por grama de fezes, podendo os animais infectados excretar entre 26 e 114.486 quistos por grama de fezes. Os picos de excreção são esporádicos e não cíclicos, sendo que a duração entre dois picos poderá ocorrer entre 2 a 7 dias e por esta razão não poderemos excluir uma infecção com base apenas num único resultado negativo (Tangtrongsup & Scorza, 2010). Um conjunto de 3 ou mais recolhas espaçadas num período de sete dias e recorrendo a mais do que um método de análise, aumentará a probabilidade de atingir um verdadeiro diagnóstico, porém numa clínica e numa abordagem mais prática esta recolha consecutiva pode, por vezes, mostrar-se pouco exequível (Dryden, Payne, & Smith, 2006).

9.1. Análises coprológicas microscópicas

A microscopia óptica continua a ser o método mais prático e económico para diagnóstico principalmente na prática veterinária clínica do dia-a-dia (Thompson, Palmer, & O'Handley, 2008). Tanto os quistos como os trofozoítos podem ser observados (Figura 13), quer por esfregaço directo ou seguidos de métodos de concentração com açúcar, sulfato de zinco ou formalina, sendo que para uma melhor observação dos trofozoítos e da sua motilidade deve ser usado um exame a fresco com fezes recentes (Geurden & Claerebout, 2010). A utilização de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) como solução para técnicas de flutuação na pesquisa de *Giardia* parece ser a ideal, principalmente por não introduzir alterações morfológicas significativas nos quistos ao contrário de soluções com açúcar ou NaCl, que provocam distorções no citoplasma dos mesmos (Dryden, Payne, & Smith, 2006; Tangtrongsup & Scorza, 2010). Uma das outras desvantagens do uso de soluções de NaCl é a rápida cristalização que ocorre à temperatura ambiente, o que torna difícil em certos casos a visualização dos parasitas. A observação das lâminas deve ser feita 15 a 20 minutos após a preparação e se tal não for possível podem ser armazenadas a 4°C durante vários dias mas não congeladas. Apesar de a sensibilidade ser menor quando comparada com outros testes, os métodos de flutuação fecal mantêm-se como os principais testes de diagnóstico de *Giardia* devido também à possibilidade de identificação de outros potenciais parasitas (Tangtrongsup & Scorza, 2010).

Podem ser adicionados vários tipos de corantes para evidenciar estruturas facilitando a identificação de quistos e trofozoítos, sendo os mais utilizados a solução de Lugol, o azul de metileno e a coloração por Giemsa (Tangtrongsup & Scorza, 2010; Geurden & Claerebout, 2010). A microscopia óptica, no diagnóstico de *Giardia*, não necessita de reagentes específicos, é simples, apresenta elevada especificidade, mas no entanto depende de um operador treinado e experiente para obter melhores resultados (Sulaiman & Cama, 2006; Geurden & Claerebout, 2010).

Figura 13 – Quistos de *Giardia*, centrifugação em ZnSO₄. Fonte: Dryden, Payne & Smith (2006)



9.2. Testes imunológicos para detecção de antígenos de *Giardia*

Existem comercialmente testes de imunofluorescência directa (IFD), ELISA e métodos de imunocromatografia qualitativa. Os testes de IFD e ELISA utilizam anticorpos monoclonais contra as proteínas presentes na parede do quisto. No entanto estes testes são objectivamente mais dispendiosos que o exame por microscopia óptica, para além de requererem técnicos especializados. No entanto existem testes de imunocromatografia que também utilizam anticorpos monoclonais direccionados contra proteínas específicas da parede dos quistos e trofozoítos, de rápida preparação e leitura tanto para animais de companhia como de pecuária (Geurden & Claerebout, 2010). É o caso do Speed[®] *Giardia* da BVT (Virbac), um teste de imunocromatografia que detecta coproantígenos dos quistos de *Giardia* e que de acordo com o fabricante apresenta uma sensibilidade de 95.6% e uma especificidade de 100%. É um teste qualitativo com um limiar de detecção de 80 quistos por grama de fezes.

É estimado um valor de 2% para falsos-positivos e falsos-negativos nos métodos de ELISA e IFD, com os primeiros a estarem provavelmente relacionados com o facto de outros coproantígenos se ligarem não-especificamente aos reagentes e os falsos-negativos estarem associados ao limiar de detecção do método em questão (Tangtrongsup & Scorza, 2010).

9.3. Métodos moleculares para pesquisa de ADN de *Giardia* - PCR

O método da Polimerase Chain Reaction (PCR) está sobretudo indicado para a identificação de diferentes espécies e genótipos de *Giardia*, particularmente na pesquisa epidemiológica e taxonómica. Em termos de diagnóstico tem elevado valor pois um quisto será suficiente para obter o resultado positivo e daí a sua elevada sensibilidade (Geurden & Claerebout, 2010). No entanto Tangtrongsup & Scorza (2010) referem que existe uma taxa de 20% de insucesso na amplificação do ADN através de PCR de *Giardia* em amostras positivas e que esse dado estará relacionado com a presença de factores de inibição nas fezes sendo que é um método dispendioso e só está aconselhado para pesquisa e identificação das *assemblages* de *G. duodenalis* no cão e no gato.

10. Tratamento

Apesar da disponibilidade e uso de vários fármacos no tratamento de infecções por *Giardia*, nenhum deles se mostrou inteiramente satisfatório devido à incidência de efeitos adversos indesejados, frequentes reinfecções, actividade sobre a flora intestinal, potencial carcinogénico e resistência do próprio parasita (Eissa & Amer, 2012). A necessidade do tratamento tanto em animais assintomáticos como aqueles que apresentam sinais clínicos associados a giardiose, está ligada ao potencial zoonótico do parasita e ao facto da importância da infecção nos animais ainda não estar completamente esclarecida (Thompson, Palmer, & O'Handley, 2008). A *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites* (ESCCAP) refere nas suas directrizes como opções de tratamento o febendazol, metronidazol, tinidazol e a combinação de fenbantel, pirantel e praziquantel (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites, 2011).

10.1. Febendazol

Trata-se de um anti-helmíntico usado num grande número de espécies animais contra inúmeros parasitas, nos quais podemos incluir ascarídeos, nematodes e cestodes. Trata-se de um benzimidazol de largo espectro contra vários parasitas internos e a sua biodisponibilidade é superior quando ingerido com alimento. Apesar de ser bem tolerado em doses até 100 vezes

a recomendada os efeitos de toxicidade por febendazol podem incluir vômitos, salivação e diarreia podendo surgir reacções de hipersensibilidade resultantes da morte dos parasitas (Plumb, 2011). É considerado seguro para ser usado em cadelas gestantes e em cachorros a partir das 6 semanas de idade, sendo considerado o tratamento de eleição na giardiose em animais gestantes ou em lactação (Thompson, *et al*, 2008; Plumb, 2011). Para o tratamento de giardiose a dose recomendada é 50 mg/kg PO, durante 3 dias consecutivos podendo prolongar-se até 7 dias se a infecção se mantiver (Thompson *et al*, 2008; Tangtrongsup & Scorza, 2010; Plumb, 2011).

10.2. Febantel/Pirantel/Praziquantel

Pirantel é um anti-helmíntico usado principalmente contra ascarídeos e em menor escala, outros nematodes, sendo fracamente absorvido no tracto gastrointestinal permitindo a sua acção na porção distal do tubo digestivo em cães. O praziquantel é também um anti-helmíntico de acção contra cestodes como é o caso do *Dipylidium caninum* e da *Taenia pisiformis* (Plumb, 2011). O febantel é considerado um pro-benzimidazol e é metabolizado em febendazol e oxfendazol (moléculas com actividade farmacológica) e apresenta larga margem de segurança no uso em cães (Thompson, Palmer, & O'Handley, 2008). A combinação destes três produtos está disponível comercialmente (Drontal® e Drontal Plus®, Bayer) e apesar da acção anti-helmíntica dos componentes também é usado contra *Giardia*. A fórmula comercial existente na Europa contém 50 mg de praziquantel, 144 mg de pirantel (pamoato) e 150 mg de febantel e recomenda que o tratamento seja prolongado durante 3 a 5 dias, PO, que vai ao encontro das directrizes da ESCCAP (Thompson *et al*, 2008; Bowman *et al*, 2009b; Tangtrongsup & Scorza, 2010; European Scientific Counsel Companion Animal Parasites, 2011).

10.3. Metronidazol

É um agente antibacteriano e antiprotozoário com actividade contra anaeróbios e age ainda como amebicida directo e tricomonicida, sendo usado contra *Trichomonas*, *Giardia*, *Balantidium coli* e *Entamoeba histolytica*. Está contra-indicado o seu uso em animais debilitados ou em recuperação, assim como em fêmeas gestantes e os seus efeitos secundários incluem alterações neurológicas, letargia, fraqueza, anorexia, vômito, diarreia, hepatotoxicidade, neutropenia e hematúria (Plumb, 2011). A sua utilização já foi indicada nos casos de infecção concomitante por *Clostridium perfringens* pela actividade antibiótica do fármaco e pelas suas propriedades anti-inflamatórias (Tangtrongsup & Scorza, 2010). A dose

de metronidazol recomendada é de 25 mg/kg BID, PO durante 5 dias (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites , 2011).

Têm sido descritos casos de resistência ao metronidazol e a consequente diminuição da sua eficácia sendo esta uma das causas apresentadas para a falha do tratamento (da Silva, et al., 2011; Eissa & Amer, 2012).

10.4. Albendazol

É um antiparasitário de largo espectro com acção contra nematodes, cestodes e protozoários, indicado sobretudo para espécies pecuárias, em particular bovinos e ovinos. Apesar da sua acção contra *Giardia* em animais de companhia devem ser tomadas precauções na administração deste medicamento devido aos seus efeitos teratogénicos e embriotóxicos podendo doses de 50 mg/kg em cães provocar anorexia (Plumb, 2011). O tratamento com albendazol em cães e gatos demonstrou a interrupção na excreção de quistos, mas esta terapia pode provocar supressão da medula óssea e pode ser considerada como causa de anemia aplástica em cães e gatos (Bowman, 2009^a; Plumb, 2011; Tangtrongsup & Scorza, 2010). As doses usadas no tratamento de giardiose, 25 mg/kg BID PO, não devem ultrapassar um total de 4 doses (Bowman, 2009a).

10.5. Outras opções de tratamento

Principalmente devido aos efeitos adversos e ao aumento dos casos de resistências reportados dos fármacos mais usados no tratamento de giardiose, novos fármacos poderão substituí-los. Temos como exemplo os nitroimidazóis, como o ronidazol e o tinidazol, sendo este último já usado no tratamento de giardiose em humanos nos EUA e o primeiro é a droga de eleição no tratamento de *Tritrichomonas foetus* em gatos. O uso de ronidazol é recomendado numa dose de 30 a 50 mg/kg, BID, PO durante 7 dias (Fiechter, Deplazes, & Schnyder, 2012) e o tinidazol numa dose de 44 mg/kg, SID, PO durante 6 dias (Bowman, 2009a).

Também pode ser usada a quinacrina, um antiprotozoário que ajuda a melhorar os efeitos da infecção por *Giardia*, mas não a elimina (Plumb, 2011), na dose de 6,6 mg/kg BID durante 5 dias (Bowman, 2009a).

O estudo realizado por Chon e Kim (2005) salienta a eficácia da combinação de silimarina, um colerético nutracêutico, com metronidazol, em comparação ao uso isolado deste último no tratamento de infecções por *Giardia*, em doses de 3,5 mg/kg de silimarina e de 50 mg/kg de metronidazol, SID, PO durante 7 dias.

O uso de miltefosina, um antiprotosoário usado no tratamento de leishmaniose, em infecções por *Giardia* também está descrito com boa actividade contra o parasita, tanto *in vitro*, como *in vivo* em ratinhos (Eissa & Amer, 2012).

11. Prevenção e controlo

A adição de fibra à dieta (ou aumentando o teor desta), pode ajudar no controlo dos sinais clínicos de giardiose em alguns animais, nomeadamente no controlo do sobrecrecimento bacteriano ou na inibição da ligação do parasita às microvilosidades intestinais (Tangtrongsup & Scorza, 2010).

A imunoterapia com vacina contra *Giardia* (GiardiaVax®, Fort Dodge) mostrou diminuir a excreção de quistos e a diarreia em alguns cães (Tangtrongsup & Scorza, 2010). No entanto, a eficácia destas vacinas tem sido questionada pelos veterinários, com a maioria a considerar que possuem pouco valor terapêutico, com estudos realizados a demonstrar a incapacidade de eliminar os organismos das fezes de cães e gatos (Bowman, 2009a). Este modelo terapêutico parece não estar mais disponível para comercialização nos EUA (Tangtrongsup & Scorza, 2010).

Apesar da possível eficácia da terapia medicamentosa na eliminação da infecção, os casos de reinfecção podem ocorrer por fontes de contaminação ambiental e se a frequência de transmissão se mantiver elevada. Este dado tem elevada importância nas comunidades ou nas instituições onde a higiene é negligenciada ou pode estar comprometida, como é o caso dos canis e gatis (Thompson A. R., 2004b). O controlo da infecção engloba a prevenção de contaminação fecal das fontes de água e alimento, adequado saneamento e desinfecção do ambiente com lisol (2% a 5%) ou hipoclorito de sódio (1%) (Bowman, 2009a). O estudo realizado por Fiechter *et al* (2012) refere a importância do banho dos animais no início e fim da terapêutica medicamentosa no sentido de eliminar os quistos presentes no pêlo dos animais, para além de outras medidas como desinfecção das jaulas também no início e fim do tratamento e a mudança de calçado do tratador de modo a prevenir a reinfecção com quistos provenientes do ambiente. Um exame fecal periódico e o tratamento com fármacos giardicidas apropriados contribuirão para prevenir a infecção por *Giardia* em cães de canis de criação, quer estes apresentem sintomas ou não (Itoh, Muraoka, Saeki, Aoki, & Itagaki, 2005).

IV. Estudo Prático – Parasitismo por *Giardia* spp. em canis de criação na região de Viseu, Portugal

1. Objectivos

A realização deste estudo teve como objectivo avaliar as diferenças entre 2 canis de criação de diferentes raças de cães na zona de Viseu e a sua relação com a prevalência de *Giardia* spp., tendo em conta o potencial zoonótico deste parasita, o risco ou impacto que o mesmo poderá ter para os agentes que lidam diariamente com os animais, o risco de infecção dos próprios animais e ainda com a comercialização dos canídeos infectados com o parasita. Dentro destes factores procurou-se analisar diferentes parâmetros como o sexo, idade, raça, doenças pré-existentes, medicação e desparasitações relacionando-os com a prevalência de *Giardia* assim como a densidade populacional em cada um dos locais observados. Procurou-se ainda analisar as diferenças em relação à facilidade de execução e de interpretação dos 3 métodos seleccionados de diagnóstico, o teste rápido Speed® *Giardia*, a flutuação passiva com ZnSO₄ e a coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen.

2. Material e métodos

2.1. Locais

Viseu, capital de distrito, é uma cidade localizada na Beira Alta, no denominado Planalto de Viseu, encerrada entre o norte e centro de Portugal. É atravessada por quatro rios, o Vouga, o Dão, o Paiva e o Pavia e apresenta um clima mediterrânico, com elevadas amplitudes térmicas, invernos rigorosos e húmidos e verões quentes e secos (Câmara Municipal de Viseu, 2012). Os 2 canis representados neste estudo encontram-se situados no concelho de Viseu, distanciados um do outro cerca de 30 km, sem existir ligação entre os animais presentes em cada um dos mesmos.

2.2. Canil/Criador nº1 (C1)

O canil denominado nº1 (C1) situa-se afastado da cidade, numa zona mais rural, sem habitações circundantes e albergava cerca de 70 cães, de 12 raças diferentes. O canil está dividido em 3 zonas com boxes (Figura 14) que alojam normalmente apenas um cão, salvo algumas excepções como é o caso dos animais jovens da mesma ninhada. Uma das zonas do canil que podemos denominar de maternidade, é onde se encontra maior concentração de animais por albergarem as fêmeas e as respectivas ninhadas. Os animais interagem entre si

sobretudo na altura dos processos de limpeza das instalações, sendo-lhes dado acesso ao exterior.

Figura 14 – Vista de uma das zonas com boxes individuais do C1



2.3. Canil/Criador nº2 (C2)

O canil C2 situa-se, rodeado por uma zona habitacional, perto do centro da cidade e albergava não mais de 10 animais de 3 raças, Boieiros de Berna (Bouvier Bernois), Doberman e Retriever do Labrador, que se encontravam alojados individualmente salvo rara exceção.

2.4. Amostras

Foram recolhidas um total de 51 amostras divididas entre os canis C1 e C2, durante o mês de Março de 2012 (Tabela 5). Procedeu-se à recolha das fezes aquando da limpeza das instalações que permitia o acesso do animal ao exterior, e normalmente nessa altura ocorria a defecação. Algumas das amostras foram recolhidas ainda dentro da box logo após a defecação. As amostras eram mantidas em contentores refrigerados, em sacos plásticos devidamente identificados com o número e data da amostra. Simultaneamente à recolha era também pedido aos criadores o preenchimento de um inquérito relativo aos dados do animal, exemplar presente no Anexo 1.

2.5. Análise estatística

Os dados resultantes da análise parasitológica das amostras e dos parâmetros recolhidos com base no preenchimento dos inquéritos, foram analisados para determinar as associações entre si, em particular as associações entre a prevalência de *Giardia* pelos 3 testes de diagnósticos e

o sexo, idade e raça dos animais, assim como a existência de medicação e a regularidade das desparasitações interna e externa. Foram utilizados os programas SPSS® 17.0 e Microsoft® Excel 2010 para a realização dos testes estatísticos e representações gráficas dos resultados obtidos. Foi usado o teste de qui-quadrado (χ^2) que permite avaliar a associação entre variáveis independentes e cujas observações são discretas, numa escala nominal e ordinal. Este teste foi realizado com um nível de significância de 0,05. Os intervalos de confiança (IC) foram calculados com auxílio da ferramenta EpiTools e com base nos valores de especificidade (Sp) e de sensibilidade (Se) já descritos. No caso do teste rápido Speed® *Giardia* os valores de Sp e Se usados foram os fornecidos pelo fabricante, respectivamente 100% e 95.6%. Em relação aos 2 outros métodos foram usados como referência os valores de Sp (94%) e Se (49%) de microscopia óptica calculados no trabalho de Rishniw, Liotta, Bellosa, Bowman e Simpson (2010).

Tabela 5 – Distribuição por canil do número de amostras recolhidas

	N	%
C1	45	88,2%
C2	6	11,8%
Total	51	100%

2.6. Análise e exames parasitológicos

Todas as amostras foram submetidas a análise num período máximo de 48 horas após recolha, no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UTL. Todas foram analisadas segundo 3 métodos distintos: Flutuação passiva pelo método de Willis com ZnSO₄ através dos kits para amostras fecais da HenrySchein® (Anexo 3); coloração dos esfregaços fecais pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (Anexo 4); teste rápido Speed® *Giardia* (Anexo 5). A escolha destes métodos baseou-se nas recomendações da *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites* (ESCCAP) e no trabalho realizado por Dryden, Payne e Smith (2006) onde é recomendado o uso de um teste de flutuação com ZnSO₄ e um teste de pesquisa de antígenos fecais para aumentar a probabilidade de atingir resultados positivos. Para além destes métodos decidimos utilizar um método de coloração em esfregaços fecais tal como descreve Bowman (2009a) para facilitar a observação de quistos e trofozoítos aumentando o contraste do núcleo dentro do organismo. No entanto decidimos aplicar a técnica de coloração por Ziehl-Neelsen modificada, já descrita na pesquisa de protozoários do género

Cryptosporidium, mas pouco referenciada no seu uso no diagnóstico de *Giardia* spp., permitindo assim avaliar a sua eficácia.

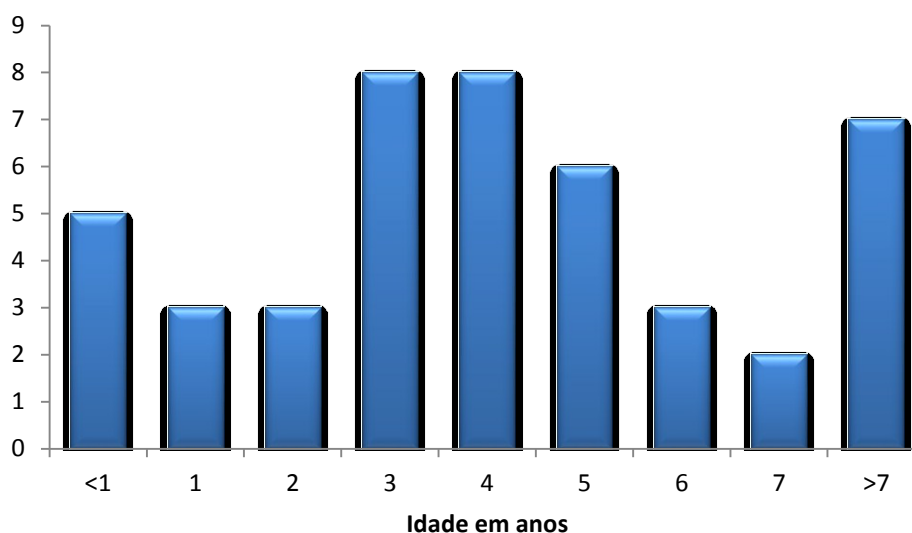
3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra no C1

Os animais do C1 apresentam uma média de idades de 4,34 anos (desvio padrão $\pm 2,92$) e cuja distribuição pode ser vista no Gráfico 2. Os grupos etários compreendem os animais jovens, com menos de 1 ano, os adultos entre 1 e 7 anos e os seniores com mais de 7 anos. Todos os animais eram alimentados com ração seca distribuída em 2 refeições diárias e com água sempre à disposição. A limpeza dos canis era efectuada diariamente da parte da manhã, através da recolha das fezes e lavagem com água e compostos comerciais à base de lixívia. Pontualmente as instalações eram sujeitas a uma limpeza com Virkon[®], um produto desinfectante com monopersulfato de potássio com amplo espectro contra vírus, bactérias e fungos.

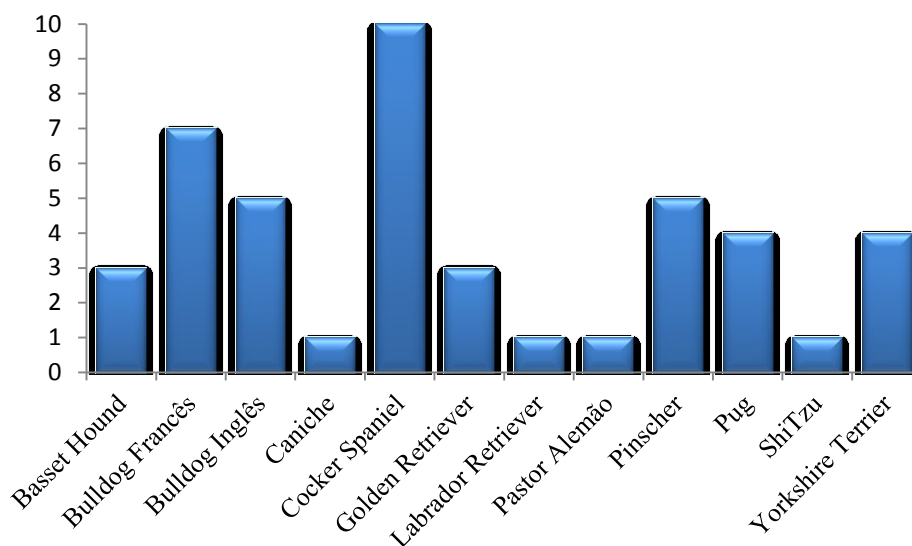
A desparasitação e vacinação dos animais nem sempre eram realizadas em intervalos regulares. As fêmeas gestantes eram desparasitadas 10 dias antes e 10 dias após o parto. Os cachorros eram desparasitados ao mês de idade. Normalmente não eram usados os mesmos produtos repetidamente, sendo usadas associações anti-parasitárias sobretudo contra helmintes, nematodes e coccídeas.

Gráfico 2 – Distribuição da idade dos animais do C1



Os animais deste canil pertenciam a 12 raças puras diferentes (as mais representadas eram Cocker Spaniel e Bulldog Francês (Gráfico 3)). Foram estudadas 45 amostras individuais no C1 das quais 26 (57,8%) correspondiam a machos e 19 (42,2%) a fêmeas.

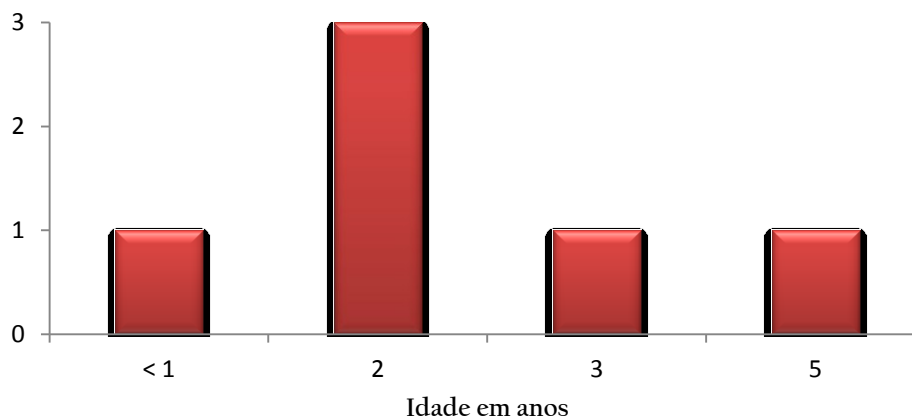
Gráfico 3 – Distribuição do número de cães por raça no C1



3.2. Caracterização da amostra do C2

A média de idades dos animais do C2 variava entre os 6 meses e os 5 anos com uma média de 2,41 anos (desvio padrão $\pm 1,49$) com a distribuição exemplificada no Gráfico 4. Os animais representados no C2 são 3 Boieiros de Berna, 2 Doberman e 1 Retriever do Labrador, dos quais 4 (66,7%) são machos e 2 (33,3%) fêmeas. Tal como no canil 1 os animais foram distribuídos em jovens (menos de 1 ano de idade) e adultos (entre 1 e 7 anos). Os animais eram vacinados anualmente contra as doenças infecciosas e raiva e as desparasitações eram efectuadas de forma regular de 4 em 4 meses com Milbemax® (milbemicina oxima e praziquantel). As instalações eram limpas diariamente com a recolha das fezes e lavagem com água dos espaços, semanalmente era realizada uma desinfecção dos locais com produtos à base de lixívia e em algumas situações era usado Pecusanol® (diazinão), um organofosforado para o controlo de vectores e ectoparasitas.

Gráfico 4 – Distribuição das idades dos animais no C2



A cada amostra, que correspondia a um animal, realizou-se o teste de flutuação passiva pelo método de Willis através dos kits de flutuação fecal HenrySchein® (Figura 15), com ZnSO_4 pela sua especificidade para os quistos de *Giardia* (Figura 16) e de acordo com as especificações do fabricante. As lâminas e lamelas resultantes, correctamente identificadas com o número da amostra e respectiva origem, foram observadas num período não superior a 30 minutos após o término do exame coprológico, na objectiva de 40x.

Figura 15 - Kits para exames fecais HenrySchein ®. Fonte: Original

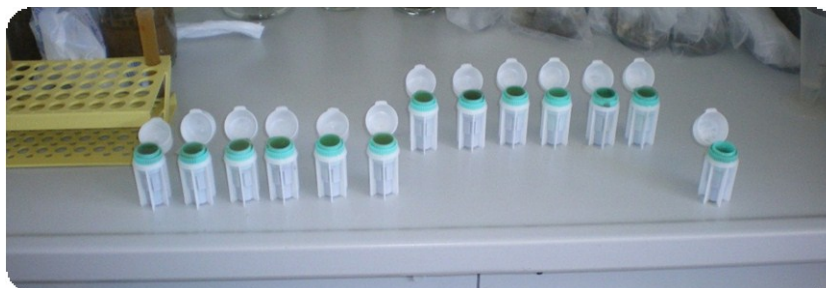
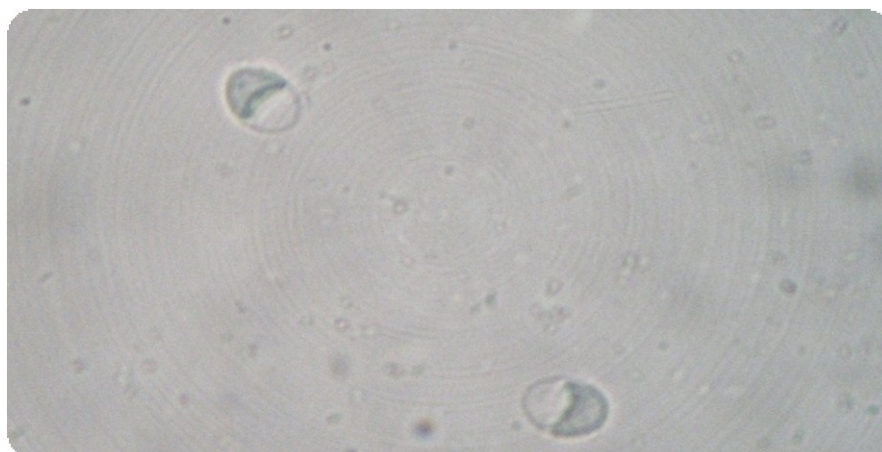


Figura 16 – Quistos de *Giardia*. Flutuação passiva com ZnSO_4 . Objectiva 40x Fonte: Original



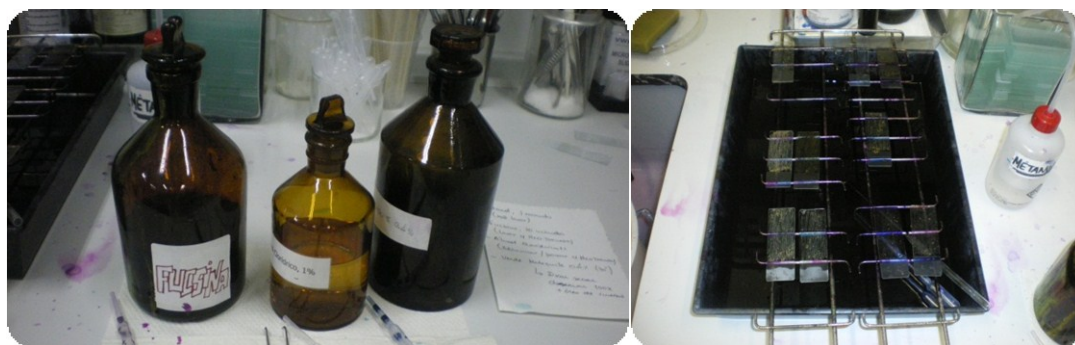
De igual forma em todas as amostras foram pesquisados corpoantigénios de *Giardia* spp. através dos testes rápidos Speed®*Giardia* da BVT, Virbac (Figura 17) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram avaliados em positivos e negativos dependendo da presença ou não das bandas azul e vermelha na tira imunocromatográfica.

Figura 17 - Testes rápidos Speed® *Giardia* da BVT, Virbac. Fonte: Original



De cada amostra foi realizado um esfregaço fecal posteriormente corado pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (Figura 18), com posterior visualização microscópica com uma ampliação de 400x.

Figura 18 – Reagentes e aspecto das preparações submetidas à técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Fonte: Original



Os resultados apresentados baseiam-se nas observações microscópicas das amostras pelo método de flutuação passiva com ZnSO_4 e coloração de Ziehl-Neelsen bem como pela análise dos testes rápidos Speed® *Giardia*.

3.3. Prevalência de *Giardia* spp.

No Canil/Criador 1 foram detectadas prevalências de 24,4% (11/45) através do teste rápido, 22,2% (10/45) pelo método de flutuação e 20,0% (9/45) pela coloração Ziehl-Neelsen, num total de 45 amostras. No Canil/Criador 2 não foi descrito detectado nenhum caso positivo nas 6 amostras recolhidas dos animais presentes nas instalações (Tabela 6). A prevalência total nos dois canis/criadores foi de 21,6% (11/51) com base no teste rápido, 19,6% (10/51) recorrendo ao método de flutuação com ZnSO_4 e de 17,6% (9/51) pela análise das amostras após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen (Tabela 7).

Tabela 6 – Prevalência de *Giardia* de acordo com os 3 métodos utilizados

Canil/Criador	Speed® <i>Giardia</i>	Flutuação ZnSO_4	Coloração Ziehl-Neelsen
C1			
<i>Frequência</i> (Positivos/n)	11/45	10/45	9/45
<i>Percentagem</i>	24,4%	22,2%	20,0%
<i>I.C. 95%</i>	14,5% - 40,5%	12,7% - 70,7%	10,5% - 65,4%
C2			
<i>Frequência</i> (Positivos/n)	0/6	0/6	0/6
<i>Percentagem</i>	-	-	-
<i>I.C. 95%</i>	-	-	-

Tabela 7 – Prevalência total de acordo com os 3 métodos utilizados

Método	Frequência	Porcentagem	I.C. 95%
Speed® Giardia	11/51	21,6%	12,6% - 36,6%
Flutuação ZnSO ₄	10/51	19,6%	9,5% - 62,9%
Coloração Ziehl-Neelsen	9/51	17,6%	7,6% - 56%

3.3.1. Prevalência por idade

De acordo com o parâmetro idade foi detectado uma maior prevalência nos animais adultos, ou seja, com idades compreendidas entre os 1 e os 7 anos, seguidos pelos animais jovens (até 1 ano de idade) sem que fossem descritos quaisquer casos positivos em animais seniores (com idades superiores a 7 anos) (Tabela 8). Dos 11 animais positivos pelo teste rápido Speed® Giardia 8 eram adultos (72,7%) e 3 eram jovens (27,3%). Entre as 10 amostras positivas pela flutuação com ZnSO₄ 7 eram de animais adultos (70%) e 3 eram jovens (30%). Com a coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen foram detectados 9 casos positivos entre os quais 7 de cães adultos (77,8%) e 2 de cães jovens (22,2%). Estes dados não evidenciaram associação entre a idade dos animais e a prevalência de *Giardia* quer para o teste rápido ($p > 0,05$; $\chi^2=3,083$), o método de flutuação ($p > 0,05$; $\chi^2=3,102$) e coloração Ziehl-Neelsen; ($p > 0,05$; $\chi^2=3,083$). No entanto, não podemos deixar de constatar que 70 a 78% das amostras positivas para *Giardia* foram assinaladas nos animais adultos.

Tabela 8 – Prevalência por idade (C1)

	Jovens	Adultos	Seniores	Total
Speed® Giardia	3 (27,3%)	8 (72,7%) $\chi^2=3,083$; $p>0,05$	-	11 (100%)
Flutuação ZnSO ₄	3 (30%)	7 (70%) $\chi^2=3,102$; $p>0,05$	-	10 (100%)
Coloração Ziehl-Neelsen	2 (22,2%)	7 (77,8%) $\chi^2=3,083$; $p>0,05$	-	9 (100%)

3.3.2. Prevalência por sexo

Foi possível detectar uma maior prevalência de *Giardia* nas fêmeas em relação aos machos como podemos verificar na Tabela 9. Dos 11 animais positivos pelo teste rápido, 10 eram fêmeas (91%) e apenas um era macho (9%). De igual modo nas análises de flutuação e coloração apenas um dos positivos correspondeu a animais do sexo masculino, com 9 fêmeas

positivas para o primeiro teste (90%) e 8 para o segundo (88,9%). Foi evidenciada uma associação entre o sexo dos animais e a prevalência de *Giardia* relativamente ao teste rápido Speed® Giardia ($p < 0,05$; $\chi^2=4,450$). O mesmo não se verificou em relação aos métodos de flutuação ($p > 0,05$; $\chi^2=3,665$) e coloração ($p > 0,05$; $\chi^2=2,934$).

Tabela 9 – Prevalência por sexo (C1)

	Machos	Fêmeas	Total
Speed® Giardia	1 (9%)	10 (91%)	11 (100%)
	$\chi^2=4,450$; $p<0,05$		
Flutuação ZnSO₄	1 (10%)	9 (90%)	10 (100%)
	$\chi^2=3,665$; $p>0,05$		
Coloração Ziehl-Neelsen	1 (11,1%)	8 (88,9%)	9 (100%)
	$\chi^2=2,934$; $p>0,05$		

3.3.3. Prevalência por raça

Os dados em relação à raça não revelam diferenças significativas entre a prevalência do parasita e as diferentes raças dos cães utilizados no estudo. Dos 11 casos positivos pelo teste rápido 3 corresponderam a cães da raça Pinscher (27,2%), 2 Bulldog Francês (18,2%) e os restantes apenas um para cada uma das seguintes raças: Bulldog Inglês, Carlin Pug, Shi Tzu, Yorkshire Terrier, Basset Hound e Cocker Spaniel (Tabela 10). De igual modo surgem as prevalências para o método de flutuação passiva em que 3 animais dos 10 positivos eram de raça Pinscher, 2 de raça Bulldog Francês e os restantes a representarem apenas um animal de cada raça, com o mesmo a verificar-se pelo método de coloração que apresentou apenas 9 animais positivos com 3 da raça Pinscher e 2 Bulldog Francês. Não foram detectadas associações entre a raça e a prevalência, através do teste de qui-quadrado, pelos 3 métodos de diagnóstico ($p>0,05$).

Tabela 10 – Prevalência por raça (C1)

	Pinscher	Bulldog Francês	Bulldog Inglês	Pug	Shi Tzu	Yorkshire Terrier	Basset Hound	Cocker Spaniel
Speed® Giardia	3 27,2%	2 18,2%	1 9,1%	1 9,1%	1 9,1%	1 9,1%	1 9,1%	1 9,1%
	$\chi^2=9,832; p>0,05$							
Flutuação ZnSO₄	3 30%	2 20%	1 10%	1 10%	1 10%	1 10%	-	1 10%
	$\chi^2=11,278; p>0,05$							
Coloração Ziehl-Neelsen	3 33,3%	2 22,3%	1 11,1%	1 11,1%	1 11,1%	1 11,1%	-	-
	$\chi^2=14,196; p>0,05$							

3.3.4. Prevalência e medicação, doença e desparasitações

Para além dos parâmetros idade, sexo e raça já apresentados foram ainda recolhidos dados em relação a outros factores como a regularidade da desparasitação interna e externa, a administração de medicação e a presença de doenças pré-existent. Em relação às desparasitações interna e externa a maior percentagem dos animais positivos para *Giardia* não se encontrava sob um esquema regular de profilaxia contra parasitas, sendo que um dos animais positivos era regularmente desparasitado para endo e ectoparasitas (Tabela 11).

Tabela 11 – Relação de prevalência com desparasitação interna/externa (C1)

	Desparasitação interna/externa	
	Regular	Não Regular
Speed® Giardia	1 (9,1%)	10 (90,9%)
	$p > 0,05$	
Flutuação ZnSO₄	1 (10%)	9 (90%)
	$p > 0,05$	
Coloração Ziehl-Neelsen	-	9 (100%)
	$p > 0,05$	

Nenhuma das amostras positivas por qualquer um dos testes correspondia a animais sob algum protocolo terapêutico (Tabela 12). Entre os 11 positivos pelo teste rápido 2 animais apresentavam doença pré-existente, em concreto alterações do foro dermatológico (sarna), e 9 não possuíam qualquer doença diagnosticada. As doenças existentes nos restantes animais, negativos para *Giardia*, incluíam neoplasias, leishmaniose, sarna, protusão da glândula de

Harder, fractura óssea, parvovirose e insuficiência cardíaca como está descrito nos anexo 6 e 7. Pelo método de flutuação passiva dos 10 positivos, 8 apresentavam-se sem qualquer doença e em 2 tenha sido diagnosticada doença (Tabela 13). Semelhante situação ocorreu pelo método de coloração em que dos 9 animais positivos, apenas um apresentou uma doença pré-existente. Não foram verificadas quaisquer associações entre estes 3 diferentes factores pesquisados nos animais da amostra e a prevalência de *Giardia*.

Tabela 12 – Relação de prevalência e medicação (C1)

	Medicação	
	Sim	Não
Speed® Giardia	-	11 (100%)
	$p > 0,05$	
Flutuação ZnSO₄	-	10 (90%)
	$p > 0,05$	
Coloração Ziehl-Neelsen	-	9 (100%)
	$p > 0,05$	

Tabela 13 – Relação de prevalência e doenças pré-existentes (C1)

	Doenças Pré-Existentes	
	Ausente	Presente
Speed® Giardia	9 (81,8%)	2 (18,2)
	$p > 0,05$	
Flutuação ZnSO₄	8 (80%)	2 (20%)
	$p > 0,05$	
Coloração Ziehl-Neelsen	8 (88,9%)	1 (11,1%)
	$p > 0,05$	

Os dados são referentes ao Canil/Criador 1 pelos quais se pesquisou a possível associação entre a prevalência de *Giardia* com os factores idade, sexo, raça, desparasitação interna/externa, medicação e doenças. Não foram detectados casos positivos para *Giardia* no Canil/Criador 2 e por isso não foi possível aplicar os testes estatísticos e pesquisar as possíveis associações já descritas.

4. Discussão

4.1. Técnicas de diagnóstico

Numa perspectiva global do número de amostras e animais analisados a taxa de prevalência foi de 21,6%. Em particular e em relação aos 3 métodos de diagnóstico obtivemos uma taxa de prevalência de 21,6% quando usado o teste rápido Speed[®] Giardia (BVT, Virbac), 19,6% determinado por microscopia óptica pelo método de flutuação passiva (Anexo 8 – Figuras 24, 25 e 26) e de 17,6% também por microscopia após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen. Estes valores vão ao encontro dos valores descritos por Epe *et al* (2010) em países europeus como Alemanha (23,75%), Espanha (25,1%), Holanda (24,62%) e Itália (25,89%) mas longe das prevalências descritas por Ferreira *et al* (2011) em Évora (47%) e por Lebre (2011) na região de Lisboa (61,1%).

As principais diferenças entre os valores de prevalência de acordo com o teste usado dependem da sensibilidade dos mesmos e da capacidade e experiência do operador em aplicar as técnicas descritas e identificar as formas biológicas do parasita em questão, devido ao facto destas serem de dimensões consideravelmente inferiores em relação aos restantes parasitas gastrintestinais.

Apesar de a análise por flutuação com ZnSO₄ ser o *gold standard* na pesquisa de *Giardia*, a eficácia deste tipo de teste requer um técnico treinado e com alguma experiência muitas vezes indisponível num ambiente mais prático de clínica ou até mesmo de hospital veterinário. O trabalho realizado por Dryden, Payne e Smith (2006) aborda esta problemática comparando a eficácia das observações efectuadas por técnicos especializados e por alunos de medicina veterinária resultando numa diferença significativa de 11 amostras determinadas negativas pelos estudantes, amostras essas que haviam sido classificadas como positivas para *Giardia* previamente.

O uso da microscopia óptica, quer nos métodos de flutuação/centrifugação com ZnSO₄ ou outra solução quer nas técnicas de coloração, na classificação das amostras suspeitas para *Giardia*, não só traz vantagens em termos de diagnóstico através da visualização do parasita como também permite a identificação de outros parasitas (Anexo 8– Figura 28) que poderão não fazer parte da lista de diagnósticos diferenciais ou do objectivo da pesquisa inicial. A possibilidade de observar outro tipo de parasitas vai permitir um diagnóstico mais preciso levando o médico veterinário a implementar uma terapêutica mais adequada. No entanto, o uso da solução de ZnSO₄ apesar de ser o mais indicado para as formas de *Giardia* revela alguns problemas na evidenciação de outros parasitas como é o caso dos ovos de *Taenia* spp, pois estes apresentam uma densidade superior. Com base neste achado alguns autores

sugerem o uso de uma solução com açúcar de Sheather ou soluções de ZnSO_4 com densidades diferentes permitindo alargar as possibilidades de pesquisa de parasitas (Dryden, Payne, & Smith, 2006).

No que se refere às técnicas de coloração usadas na pesquisa de *Giardia* estão descritas várias e com diferentes resultados. O esfregaço fecal directo numa solução salina, até 20 minutos após recolha vai permitir visualizar os trofozoítos e a sua motilidade apesar de não permitir evidenciar as suas estruturas (Conboy, 1997). A coloração do esfregaço vai possibilitar um melhor contraste e visualização de estruturas como o corpo mediano e disco ventral característicos deste parasita, embora ao matar o protozoário não permita avaliar a sua motilidade. Colorações como Giemsa, solução de Lugol ou o Tricrómio de Mason, têm sido usadas para evidenciar trofozoítos e quistos. A técnica de Ziehl-Neelsen nos esfregaços fecais, pouco referenciada em amostras de *Giardia* (Anexo 8 – Figura 27), foi escolhida para este estudo pese a sua especificidade para *Cryptosporidium*. No entanto procurámos determinar se seria também uma opção viável noutros protozoários aliado ao facto de as pesquisas de *Giardia* e *Cryptosporidium* normalmente se encontrarem associadas.

O teste rápido Speed[®] *Giardia* demonstrou ser um método simples de aplicar, de clara interpretação dos resultados e acima de tudo rápido quando comparado com os restantes métodos usados, tendo em conta o número de amostras e a janela temporal disponível para a sua análise. Aliada à vantagem de rápida execução a simplicidade de aplicação permite reduzir a possibilidade de erros por parte do operador e consequentemente menos erros nos resultados apresentados. Parece tratar-se de um teste suficientemente sensível para detectar casos de giardiose quando são excretados níveis razoavelmente elevados de antígenos nas fezes (Mosallanejad, Reza, Razi Jalali, & Alborzi, 2010).

Os resultados descritos por Eduardo (2008) referem uma concordância estatística entre os métodos imunocromatográficos e o exame microscópico quando analisadas amostras caninas. O teste rápido Speed[®] *Giardia* foi também usado no estudo levado a cabo por Mosallanejad *et al* (2010) na província de Ahvaz no Irão, levando os autores a concluir que a sensibilidade deste teste é superior e mais precisa quando comparado com o método microscópico. No nosso estudo e apesar de o número de amostras ser consideravelmente inferior aos estudos referenciados, foi também revelado uma concordância estatística entre os métodos de diagnóstico utilizados ($k_1=0,933$; $k_2=0,938$; $k_3=0,872$).

Teremos de ter ainda em consideração o facto de neste presente estudo não ter sido possível recolher amostras seriadas num mínimo de 3 num espaço entre 3 a 5 dias como é recomendado pela ESCCAP para se atingir um diagnóstico mais aproximado do correcto

tendo em conta a excreção intermitente dos quistos de *Giardia*. Neste estudo, as amostras representam uma colheita única em cada um dos canis/criadores estudados e assim sendo a ausência de amostras negativas para o C2 não pode excluir por completo a possibilidade de existência de *Giardia*, mesmo se tratando de animais que não apresentavam qualquer sintomatologia à data das recolhas.

4.2. Prevalência e parâmetros

4.2.1. Idade

A associação entre a idade dos animais e a prevalência de *Giardia* tem sido descrita por vários estudos com a maioria a referir um maior risco de infecção nos animais jovens, com idades inferiores a 12 meses. O estudo europeu realizado por Epe *et al* (2010) demonstra um risco elevado nos animais com menos de 6 meses com 42,86% das amostras positivas. No mesmo sentido também Mircean, Gyorke e Cozma (2012) no seu estudo realizado na Roménia em 614 animais de idades compreendidas entre os 1 e 16 anos de idade, identificaram os cães com menos de 12 meses que vivem em comunidades como um grupo de risco. A maior sensibilidade dos animais jovens para a infecção por *Giardia* pode estar relacionada com a falta de maturidade do seu sistema imunitário e também com comportamentos característicos de animais jovens como o lambar ou morder objectos ou até a coprofagia (Mundim, Rosa, Hortêncio, Faria, Rodrigues, & Cury, 2007). Apesar destas referências o nosso estudo não revelou qualquer associação entre a idade dos animais e a prevalência de *Giardia*, tendo até sido observado uma maior percentagem de cães adultos positivos o que podemos relacionar com o número de animais com idades inferiores a 12 meses (5/45) e o de animais adultos (33/45) tal como o encontrado por Lebre (2011).

4.2.2. Sexo

Com base em resultados recentes não parece existir uma relação sustentável entre a prevalência de *Giardia* e o sexo do animal. Os estudos realizados por Epe *et al* (2010) e Mosallanejad *et al* (2010) referem uma maior prevalência de animais do sexo masculino sem que seja observável uma associação estatística entre estes factores. No entanto no trabalho realizado em Portugal, Lebre (2011) não observa qualquer associação estatística entre a prevalência do parasita e o sexo dos animais presentes no canil. Considerando os resultados apresentados no presente estudo, foi observada uma maior percentagem de fêmeas susceptíveis à infecção salientando a existência de um número de machos (26/45) superior em relação às fêmeas (19/45) no C1. A razão para este facto poderá estar relacionada com os

comportamentos adoptados pelas fêmeas sobretudo durante o período de gestação e pós-parto. As acções de higiene por parte da cadela em relação aos cachorros tais como a coprofagia, característica nas primeiras semanas de idade podem aumentar o risco de infecção mantendo o ciclo de transmissão entre mãe e filhos. O estudo realizado no Japão em canis de criação (Itoh, Muraoka, Saeki, Aoki, & Itagaki, 2005) determinou não existir relação entre a infecção por *Giardia* e a co-habitação de mães e filhos, levando a considerar que a transmissão vertical terá pouco efeito na infecção em comparação com a transmissão horizontal por quistos presentes no ambiente em que os animais se encontram. Numa comparação de género e origem dos animais (Meireles, Montiani-Ferreira, & Thomaz-Soccol, 2008) foram observadas prevalências superiores em machos para os animais presentes num abrigo/canil mas o contrário também foi detectado num ambiente doméstico onde as fêmeas apresentavam mais casos positivos.

4.2.3. Raça

Estão representadas neste estudo várias raças de vários grupos reconhecidos pela FCI, porém não foram detectadas associações entre as raças e a prevalência de *Giardia*, considerando também que não podemos tirar uma conclusão apropriada com valores de $n=1$. O estudo de Upjohn *et al* (2010) revela uma associação entre os animais da raça Rottweiler e o risco de infecção por *Giardia* levando os autores a mostrarem alguma surpresa face a este resultado e deixarem indicações para estudos futuros. Num estudo recente com 64 amostras de cães de raça pura e 64 de cães raça cruzada (Katagiri & Oliveira-Sequeira, 2007) não foi evidenciada nenhuma relação entre estes factores. No entanto o trabalho de Fontanarrosa, Vezzani, Basabe e Eiras, (2006) salienta que apesar de não terem sido encontradas nas prevalências globais dos parasitas pesquisados, 3 das espécies de protozoários nas quais se inclui *Giardia duodenalis*, foram mais frequentes em raças puras.

4.2.4. Desparasitações, medicação e doenças

Apesar das elevadas prevalências de *Giardia* detectadas tanto em canis como em animais presentes à consulta, muitos dos casos referem-se a portadores assintomáticos. Estudos como os de Tangtrongsup e Scorza (2010) destacam a importância de doenças imunossupressoras, tanto em animais como em humanos, e a potencialidade de desenvolverem sinais clínicos de giardiose. No nosso estudo não se evidenciou nenhuma relação entre a presença de doença pré-existente e a infecção por *Giardia*, salientando que os casos positivos e com doença se tratavam de animais com alterações dermatológicas devido a ectoparasitas.

No que se refere à medicação e à sua influência sobre a giardiose também não parece existir associação evidente, o que está de acordo com o evidenciado por Scaramozzino *et al* (2009). Do mesmo modo que doenças imunossupressoras podem potencializar os efeitos da infecção também fármacos com o mesmo efeito tais como corticosteróides, poderão influenciar os mecanismos de resposta do organismo permitindo a progressão do parasita.

Os protocolos de desparasitação interna/externa são um passo importante no controlo da infecção e sua transmissão, procurando sempre atingir níveis elevados de eficácia apenas possíveis se aplicados os compostos adequados e cumpridos os prazos estipulados. A manutenção do ciclo de vida e as prevalências elevadas de *Giardia*, podem estar relacionadas com o uso rotineiro de anti-helmínticos e das suas doses, nos animais jovens (grupo de risco), que apesar de elevada eficácia contra parasitas como *Toxocara* spp não afectam os protozoários entéricos (Thompson A. R., 2000). Aliás o estudo realizado por Bugg, Robertson, Elliot e Thompson (1999) reconheceu que a prevalência de *Giardia* se encontra directamente associada com o número de doses de anti-helmínticos por ano, aumentando 1,2 vezes por cada dose administrada.

No nosso estudo o canil C1 não aplicava intervalos de desparasitação regulares, o que pode pôr em causa a eficácia dos compostos usados, levando a eventuais casos de resistência. No entanto, não foram observadas associações entre a regularidade das desparasitações internas/externas e a prevalência de *Giardia*.

4.3. Prevalências e canis

Neste estudo foram escolhidos 2 canis/criadores com diferenças em vários aspectos procurando estudar os seus efeitos na presença/ausência de infecção por *Giardia*. O C1 como já foi referido albergava um número consideravelmente superior de animais sem que isso interfira no espaço disponível para cada animal sendo equitativamente comparável ao que é verificado no C2. Um elevado número de animais num espaço de habitabilidade limitado pode promover a contaminação, consequentemente elevando o risco de infecção (Mundim, Rosa, Hortêncio, Faria, Rodrigues, & Cury, 2007). A interacção dos animais ocorre em C1 e C2, sobretudo na altura dos processos de limpeza, o que apesar da sua importância em termos de sociabilização se revê como mais um factor de risco na transmissão do parasita e manutenção do seu ciclo de vida.

Os esquemas de limpeza diferiam ligeiramente entre C1 e C2 com o número de animais a ser também aqui um factor a ter em conta. As limpezas diárias no C1 baseavam-se na recolha dos dejectos e lavagem das instalações com água e detergentes comerciais com o pontual uso de

uma solução de monopersulfato de potássio. No C2 o esquema é semelhante em termos de limpezas diárias, mas os responsáveis pelo C2 realizam uma limpeza semanal com produtos à base de lixívia e em certas situações organofosforados como o diazinão. Na prevenção de *Giardia* está descrito que a inativação dos quistos no ambiente pode ser atingida com a desinfecção através de vapor ou recorrendo ao uso de compostos de amónio quaternário (Tangtrongsup & Scorza, 2010). O estudo realizado por Fiechter, Deplazes e Schnyder (2012) assume que a reinfecção por quistos no ambiente será melhor controlada com a implementação de medidas de higiene intensivas tais como desinfecções antes e após o tratamento, reconhecendo que o uso de detergentes e água quente com espuma não foram eficazes no controlo das reinfecções. Para além das desinfecções das instalações e banhos dos animais outras possíveis fontes de contaminação como a água e a comida podem ser responsáveis pela transmissão de quistos e trofozoítos tal como referem Papini *et al* (2005) salientando que num ambiente de canil é possível que a alimentação húmida comercial possa ser mais facilmente contaminada por quistos de *Giardia* permitindo a sua sobrevivência quando comparadas com ração seca.

Há no entanto diferenças consideráveis no que se refere aos esquemas de desparasitação dos animais com o C2 a apresentar intervalos regulares de 4 meses em comparação com o C1 em que os esquemas de desparasitação, de uma forma geral, nem sempre cumprem os intervalos pretendidos, considerando que provavelmente nenhum dos cães de criação estará a usar o mais eficaz composto ou associações de compostos no combate a *Giardia*, uma vez que parece não existir consenso sobre a eficácia dos antiparasitários disponíveis na prevenção da infecção, uma teoria que pode ser apoiada pela contínua elevada prevalência deste parasita em cães de diferentes origens.

O reduzido número de animais presentes no C2 permite aos seus donos e tratadores uma atenção mais cuidada em particular no que se refere a banhos e escovagem do pêlo, um factor relevante no processo de transmissão de *Giardia* como descreve o trabalho realizado por Fiechter, Deplazes e Schnyder (2012). Considerando sobretudo as diferenças ao nível da densidade populacional, dos esquemas de limpeza e de desparasitações poderemos assumir estes factores como importantes na transmissão e manutenção da infecção com base nos resultados positivos apresentados para o C1 e a ausência dos mesmos no C2.

Existem, ainda nos dias de hoje, dúvidas sobre o potencial zoonótico de *Giardia*. Como já foi referido os cães possuem *assemblages* específicas, C e D (*Giardia canis*), assim como os humanos têm o seu grupo antroponótico que engloba as *assemblages* A e B. Na verdade os cães são infectados com uma mais ampla variedade de *assemblages* com estudos a revelarem

uma prevalência moderada a elevada de assemblage A (Xiao & Fayer, 2008). Os dados porém continuam a demonstrar casos de ausência de *assemblages* zoonóticas nos cães como é visto no estudo realizado por Paz e Silva e Monobe (2012) em que apenas foram isoladas *assemblages* C e D, surgindo no entanto evidências da presença das *assemblages* zoonóticas A e B como refere o estudo realizado por Eduardo (2008) em Portugal identificando o genótipo A1 em 64,5 % das amostras caninas recolhidas. O estudo realizado em clínicas veterinárias na Alemanha (Barutzki, Thompson, Wielinga, Parka, & Schaper, 2007) detectou num total de 58 amostras positivas para *Giardia* que 7% correspondiam a *assemblages* A. Upjohn *et al* (2010) através da análise aos animais em canil na zona de Londres obteve uma maior prevalência para as *assemblages* específicas para os cães (C e D) e apenas uma amostra positiva relativa à assemblage zoonótica A.

Bowman e Lucio-Forster (2010) mencionam que o risco de os humanos contraírem a infecção através dos seus animais de companhia é basicamente zero comparando com outras fontes de contaminação, exceptuando os casos de imunossupressão severa. Um estudo mais aprofundado em termos genéticos (Cacciò & Ryan, 2008) demonstra que os subtipos das *assemblages* A e B encontradas nos cães não são geneticamente idênticas às presentes nos humanos. Foi sugerido por Thompson e Monis (2004) que podem ocorrer 2 ciclos de transmissão nos cães com o favorecimento do ciclo que engloba as *assemblages* específicas do cão a ocorrer pelo contacto intensivo entre um elevado número de animais a habitar em conjunto (canis) permitindo a estas *assemblages* dominar as restantes; em cães domésticos a frequência de transmissão entre cães será consideravelmente inferior criando condições para as infecções por *assemblages* A persistirem.

Considerando importante ou menos relevante o risco de contágio entre humanos e cães, não estará em causa a necessidade de tratar os animais infectados quer estes apresentem sintomatologia ou não, tanto em termos da saúde do indivíduo mas também analisando o caso numa perspectiva global procurando impedir o contágio de outros animais. O papel do veterinário junto dos donos será de extrema relevância alertando para a importância do tratamento, dependendo do mesmo aplicar os seus conhecimentos de modo a atingir níveis elevados de eficácia na eliminação do parasita.

5. Conclusão

Finalizando este estudo devemos acima de tudo considerar estes resultados assim como os métodos escolhidos, um ponto de partida para futuras pesquisas de *Giardia* em outras áreas das populações caninas e não só, tentando estabelecer uma associação entre as prevalências reportadas e a linha temporal observando os resultados dos tratamentos e estratégias de prevenção postos em prática.

Os resultados apresentados, com especial atenção para a prevalência global de 21,6%, vão de encontro a uma variedade de estudos realizados a nível mundial, permitem-nos avaliar outras populações caninas que em Portugal não têm sido estudadas. A importância dos canis de criação no mercado nacional tem sido crescente no número de animais e raças movimentados. Considerando que se trata de animais que poderão fazer parte de um agregado familiar, terá de ser dada especial atenção ao grau de parasitismo que os mesmos apresentam na altura da compra/adopção.

Este estudo veio demonstrar que a elevada prevalência de *Giardia* já demonstrada em canis municipais e centros de acolhimento e de adopção de animais, também pode ser encontrada em canis de criação tal como é visível na conclusão do trabalho realizado por Itoh *et al* (2005) onde se pode ler que *G.intestinalis* invadiu largamente os canis de criação no Japão. A prevalência total de 21,6% detectada no nosso estudo apesar de relativamente inferior da encontrada no Japão (37,4%) através dos testes de pesquisa de coproantígenos, demonstra resultados elevados nesta população canina.

Apesar da inexistência de associações estatísticas significativas destaca-se a importância dos factores como a desparasitação, os esquemas de limpeza e desinfecção mas sobretudo o número de animais na manutenção das infecções por *Giardia* e no seu ciclo de transmissão. Torna-se visivelmente mais eficaz o controlo e aplicação das medidas preventivas assim como dos tratamentos numa população com menor número de animais com elevada importância na disrupção do ciclo biológico do parasita. Não podemos negligenciar factores como a idade e o sexo e o seu papel na manutenção da infecção. Apesar de não termos detectado significância entre a idade e a existência de infecção, salientamos que entre 70 a 78% dos animais eram adultos, dados que se afastam de outros estudos que referem uma relação entre os animais jovens e a infecção. A associação significativa detectada em fêmeas traz uma novidade em relação ao já descrito e pode tratar-se de um dado importante nos animais presentes neste tipo de instalações.

Em relação aos métodos de diagnóstico salienta-se a facilidade e rapidez na apresentação dos resultados do teste rápido Speed[®] *Giardia* e da sua mais-valia na clinica ou hospital

veterinário como forma de rastreio dos animais presentes à consulta, sobretudo aqueles que se apresentam assintomáticos. As prevalências de 21,6%, 19,6% e 17,6% observadas nos 3 métodos apesar não apresentarem diferenças muito significativas salientam uma percentagem superior detectada pelo teste rápido. Este facto reforça a necessidade de realizar mais do que um teste de diagnóstico com o objectivo de obter um diagnóstico mais correcto e na tentativa de diminuir as possibilidades de falsos negativos.

Apesar de não ter sido efectuada a genotipagem das amostras positivas de *Giardia* não podemos descurar o potencial zoonótico deste protozoário que deve ser considerado e reconhecido pelos responsáveis e tratadores do canil assim como dos futuros donos dos animais.

6. Perspectivas futuras

Durante a realização deste trabalho foram surgindo ideias sobre como melhorar um possível futuro estudo nesta área. O estudo parasitológico em canis de criação não tem sido muito explorado em Portugal, pelo menos quando comparado com os estudos em canis municipais e instituições de adopção animal. Consideramos ser importante um estudo mais aprofundado nos canis de criação, não só para *Giardia* mas uma pesquisa mais vasta em espécies de parasitas gastrointestinais, ou pelo menos aquelas que poderão apresentar um risco zoonótico. Seria interessante realizar uma pesquisa nacional ou pelo menos regional neste tipo instalações, adoptando um modelo científico um pouco diferente daquele que aqui foi apresentado, apostando sobretudo num maior número de amostras por animal com a possibilidade de agregar à pesquisa dos parâmetros descritos neste estudo a pesquisa do efeito dos tratamentos convencionais para *Giardia* nos animais presentes em canis de criação. Outro aspecto igualmente interessante a analisar seria o real potencial zoonótico, realizando para isso um estudo parasitológico dos donos e membros da família, assim como a caracterização genética dos agentes encontrados.

BIBLIOGRAFIA

- Adam, R. D. (2001). Biology of Giardia lamblia. *Clinical Microbiology Reviews Vol 14 (3)*, pp. 447-475.
- Andrews, R., Monis, P. T., Ey, P. L., & Mayrhofer, G. (1998). Comparison of the levels of intra-specific genetic variation within Giardia muris and Giardia intestinalis. *International Journal of Parasitology*, pp. 1179-1185.
- Ankarklev, J., Jerlstrom-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., & Svard, S. G. (2010). Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of Giardia species. *Nature Reviews Microbiology Vol 8*, pp. 413-422.
- Bajer, A., Bednarska, M., & Rodo, A. (2011). Risk factors and control of intestinal parasite infections in sled dogs in Poland. *Veterinary Parasitology 175*, pp. 343-350.
- Ballweber, L. R., Xiao, L., Bowman, D. D., Kahn, G., & Cama, V. A. (2010). Giardiasis in dogs and cats: Update on epidemiology and public health significance. *Trends in Parasitology 26 (4)*, pp. 180-189.
- Barutzki, D., Thompson, R., Wielinga, C., Parka, U., & Schaper, R. (2007). Observations on giardia infection in dogs from veterinary clinics in Germany. *Parasitology Research 101*, pp. 153-156.
- Bednarska, M., Bajer, A., Sinski, E., Girouard, A. S., Tamang, L., & Graczyk, T. K. (2006). Fluorescent in situ hybridization as a tool to retrospectively identify Cryptosporidium parvum and Giardia lamblia in samples from terrestrial mammalian wildlife.
- Beugnet, F., Guillot, J., Polack, B., & Chermette, R. (2000). Enquête sur le parasitisme digestif des chiens et des chats de particuliers de la région parisienne. *Revue de Medicine Veterinaire 151 (5)*, pp. 443-446.
- Bowman, D. D. (2009a). *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. St Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Bowman, D. D., & Lucio-Forster, A. (2010). Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. *Experimental Parasitology 124*, pp. 121-127.
- Bowman, D. D., Liotta, J. L., Ulrich, M., Charles, S. D., Heine, J., & Schaper, R. (2009b). Treatment of naturally occurring, asymptomatic Giardia spp. in dogs Drontal Plus flavour tablets. *Parasitology Research 105*, pp. 125-134.
- Bugg, R., Robertson, I., Elliot, A., & Thompson, R. (1999). Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, western Australia. *The Veterinary Journal 157*, pp. 295-301.

- Buret, A. G. (2008). Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite* 15, pp. 261-265.
- Cacciò, S. M., & Ryan, U. (2008). Molecular Epidemiology of Giardiasis. *Molecular & Biochemical Parasitology*, pp. 75-80.
- Câmara Municipal de Viseu. (2012). *Câmara Municipal de Viseu*. Obtido em 2 de Julho de 2012, de <http://www.cm-viseu.pt/index.php/conhecer-viseu/natural>
- Carlin, E., Bowman, D., & Scarlett, J. (2006). Prevalence of giardia in symptomatic dogs and cats in the United States. *Continuing Education for Veterinarians* 28 (11A), pp. 1-12.
- Casemore, D. (1991). Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology* 44, pp. 445-451.
- Cavalier-Smith, T. (2003). Protist phylogeny and the high-level classification of protozoa. *European Journal of Protistology*, 39, pp. 338-348.
- Chon, S.-K., & Kim, N.-S. (2005). Evaluation of silymarin in the treatment on asymptomatic giardia infections in dogs. *Parasitology Research* 97, pp. 445-451.
- Claerebout, E., Casaert, S., Dalemans, A.-C., De Wilde, N., Levecke, B., Vercruysse, J., et al. (2009). Giardia and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium. *Veterinary Parasitology* 161, pp. 41-46.
- Conboy, G. (1997). Giardia. *The Canadian Veterinary Journal*, pp. 245-247.
- da Silva, A. S., Castro, V. S., Tonin, A. A., Brendler, S., Costa, M. M., Jaques, J. A., et al. (2011). Secnidazole for the treatment of giardiasis in naturally infected cats. *Parasitology International* 60, pp. 429-432.
- Dobell, C. (1919). The Discovery of the intestinal protozoa of man. *Section of the History of Medicine*, pp. 1-15.
- DPDx. (2010). *Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern*. Obtido em 3 de Julho de 2012, de Centers for Disease Control and Prevention: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Giardiasis_il.htm
- Dryden, M. W., Payne, P. A., & Smith, V. (2006). Accurate diagnosis of Giardia spp and proper fecal examination procedures. *Veterinary Therapeutics Vol 7 (1)*, pp. 4-14.
- Dubná, S., Langrová, I., Nápravník, J., Jankovska, I., Vadlecjh, J., Pekár, S., et al. (2007). The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* 145, pp. 120-128.

- Eduardo, J. M. (2008). Caracterização genética de *Giardia lamblia* de origem animal ou humana em Portugal. *Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular*. Aveiro: Universidade de Aveiro - Departamento de Biologia.
- Eissa, M. M., & Amer, E. I. (2012). *Giardia lamblia*: A new target for miltefosine. *International Journal for Parasitology* 42, pp. 443-452.
- Eligio-Garcia, L., Cortes-Campos, A., & Jimenez-Cardoso, E. (2005). Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasitology Research* 97, pp. 1-6.
- Elmendorf, H. G., Dawson, S. G., & McCafrey, J. M. (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *International Journal of Parasitology* 33, pp. 3-28.
- Epe, C., Rehker, G., Shnieder, T., Lorentzen, L., & Kreienbrock, L. (2010). *Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe - Results of a european study. *Veterinary Parasitology* 173, pp. 32-38.
- Erlandsen, S. (18 de Março de 2005a). *Public Health Image Library #11650*. Obtido em 3 de Julho de 2012, de Centers for Disease Control and Prevention: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>
- Erlandsen, S. (18 de Março de 2005b). *Public Health Image Library #11651*. Obtido em 3 de Julho de 2012, de Centers for Disease Control and Prevention: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites . (2011). Control of intestinal protozoa in dogs and cats. *ESCCAP Guidelines 06 First Edition*, 1-24. Worcestershire, UK: ESCCAP.
- Faubert, G. (2000). Immune Response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Reviews* Vol 13 (1), pp. 35-54.
- Ferreira, F., Pereira-Baltasar, P., Parreira, R., Padre, L., Vilhena, M., Távora Távora, L., et al. (2011). Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal. *Veterinary Parasitology*, pp. 242-245.
- Fiechter, R., Deplazes, P., & Schnyder, M. (2012). Control of giardia infections with ronidazole and intensive hygiene management in a dog kennel. *Veterinary Parasitology*, pp. 93-98.
- Fiechter, R., Deplazes, P., & Schnyder, M. (2012). Control of giardia infections with ronidazole and intensive hygiene management in a dog kennel. *Veterinary Parasitology* 187, pp. 1-6.

- Filice, F. (1952). Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ. California Publ. Zool.* 57, pp. 53-146.
- Fontanarroza, M. F., Vezzani, D., Basabe, J., & Eiras, D. F. (2006). An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from southern greater Buenos Aires (Argentina): Age, gender, breed, mixed infections and seasonal and spatial patterns. *Veterinary Parasitology* 136, pp. 283-295.
- Franzén, O., Jerlstrom-Hultqvist, J., Castro, E., Sherwood, E., Ankarklev, J., Reiner, D., et al. (2009). Draft genome sequencing of *Giardia intestinalis* assemblage B Isolate GS: Is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathog* 5(8): e1000560. doi:10.1371/journal.ppat.1000560, pp. 1-14.
- Geurden, T., & Claerebout, E. (2010). Relevance of *Giardia* infections in Veterinary Medicine. In G. V. LaMann, *Veterinary Parasitology* (pp. 201-222). New York, USA: Nova Science Publishers, Inc.
- Hamnes, I. S., Gjerde, B. K., & Robertson, L. J. (2007). A longitudinal study on the occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dogs during their first year of life. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49:22, pp. 1-10.
- Homan, W., van Enkevort, F., Limper, L., van Eys, M., Schoone, J., Kasprzak, W., et al. (1992). Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitology Research*, pp. 316-323.
- Hunter, P. R., & Thompson, A. R. (2005). The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology* 35, pp. 1181-1190.
- Itoh, N., Muraoka, N., Saeki, H., Aoki, M., & Itagaki, T. (2005). Prevalence of *Giardia intestinalis* infection in dogs of breeding kennels in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* 67(7), pp. 717-718.
- Júlio, C., Vilares, A., Oleastro, M., Ferreira, I., Gomes, S., Monteiro, L., et al. (2012). Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: a case study in Portugal. *Parasites and Vectors* 5:22, pp. 1-8.
- Katagiri, S., & Oliveira-Sequeira, T. (2007). Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo state, Brazil. *Zoonoses and Public Health*, pp. 406-413.
- Kofoed, C. A., & Christiansen, E. B. (1915). On the life history of *Giardia*. pp. 547-552.
- Lauwaet, T., Davids, B. J., Reiner, D. S., & Gillin, F. D. (2007). Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Current Opinion in Microbiology* 10, pp. 554-559.

- Lebre, F. (2011). Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. *Rastreo de Parasitas Gastrintestinais e seu Impacto Zoonótico em Cães de Canil da Cidade de Lisboa*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Meireles, P., Montiani-Ferreira, F., & Thomaz-Soccol, V. (2008). Survey of giardiosis in household and shelter dogs from metropolitan areas of Curitiba, Paraná state, southern Brazil. *Veterinary Parasitology* 152, pp. 242-248.
- Meloni, B. P., Lymbery, A. J., & Thompson, A. R. (1989). Characterization of Giardia isolates using a non-radiolabeled DNA probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40 (6), pp. 629-637.
- Mendonça, C., Almeida, A., Castro, A., Delgado, M. d., Soares, S., Costa, d., et al. (2007). Molecular characterization of Cryptosporidium and Giardia isolates from cattle from Portugal. *Veterinary Parasitology* 127, pp. 47-50.
- Mircean, V., Gyorke, A., & Cozma, V. (2012). Prevalence and risk factors of Giardia duodenalis in dogs from Romania. *Veterinary Parasitology* 184, pp. 325-329.
- Miró, G., Mateo, M., Montoya, A., Vela, E., & Calonge, R. (2007). Survey of intestinal parasites in stray dogs in the Madrid area and comparison of the efficacy of three anthelmintics in naturally infected dogs. *Parasitology Research* 100, pp. 317-320.
- Mosallanejad, B., Reza, A., Razi Jalali, M., & Alborzi, A. R. (2010). Antigenic detection of Giardia duodenalis in companion dogs of Ahvaz area, south-west of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 3(4), pp. 187-193.
- Muller, N., & von Allmen, N. (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with Giardia lamblia infections. *International Journal for Parasitology* 35, pp. 1339-1347.
- Mundim, M., Rosa, L., Hortêncio, S., Faria, E., Rodrigues, R., & Cury, M. (2007). Prevalence of Giardia duodenalis and Cryptosporidium spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil. *Veterinary Parasitology* 144, pp. 356-359.
- Naess, H., Nyland, M., Hausken, T., Follestad, I., & Nyland, H. I. (2012). Chronic fatigue syndrome after Giardia enteritis: clinical characteristics, disability and long-term sickness absence. *BMC Gastroenterology* 12:13, pp. 1-7.
- Paget, T. A., Jarroll, E. L., Manning, P., Lindmark, D. G., & Lloyd, D. (1989). Respiration in the Cysts and Trophozoites of Giardia muris. *Journal of General Microbiology* 135, pp. 145-154.

- Palmer, C. S., Thompson, A. R., Traub, R. J., Rees, R., & Robertson, I. D. (2008). National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Veterinary Parasitology* 151, pp. 181-190.
- Papini, R., Gorini, G., Spaziani, A., & Cardini, G. (2005). Survey on giardiasis in shelter dog populations. *Veterinary Parasitology* 128, pp. 333-339.
- Paz e Silva, F. M., & Monobe, M. M. (2012). Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. *Parasitology Research* 110, pp. 325-334.
- Plumb, D. C. (2011). *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. John Wiley & Sons.
- Plutzer, J., Ongerth, J., & Karanisc, P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213, pp. 321-333.
- Rishniw, M., Liotta, J., Bellosa, M., Bowman, D., & Simpson, K. W. (2010). Comparison of 4 diagnostic tests in diagnosis of naturally acquired canine chronic subclinical giardiasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, pp. 293-297.
- Rosa, L., Gomes, M., Mundim, A., Mundim, M., Pozzer, E., Faria, E., et al. (2007). Infection of dogs by experimental inoculation with human isolates of *Giardia duodenalis*: Clinical and laboratory manifestations. *Veterinary Parasitology* 145, pp. 37-44.
- Roxstrom-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E., & Svard, S. G. (2006). *Giardia* immunity - an update. *Trends in Parasitology* 22(1), pp. 26-31.
- Savioli, L., Smith, H., & Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology* 5 (2), pp. 203-208.
- Scaramozzino, P., Di Cave, D., Berrilli, F., D'Orazi, C., Spaziani, A., Mazzanti, S., et al. (2009). A study of the prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* infecting kennelled dogs. *The Veterinary Journal* 182, pp. 231-234.
- Scott, K. G.-E., Meddings, J. B., Kirk, D. R., Lees-Miller, S. P., & Buret, A. G. (2002). Intestinal infection with *Giardia* reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology* 123, pp. 1179-1190.
- Scott, K. G.-E., Yu, L. C., & Buret, A. G. (2004). The role of CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infection and Immunity* vol 72 (6), pp. 3536-3542.
- Smith, H. V., & Paget, T. (2007). *Giardia*. In S. Simjee, *Infectious Disease: Foodborne Diseases* (pp. 303-336).

- Smith, H. V., Cacciò, S. M., Cook, N., Nichols, R. A., & Tait, A. (2007). Cryptosporidium e Giardia as foodborne diseases. *Veterinary Parasitology* 149, pp. 29-40.
- Solarczyk, P., & Majewska, A. (2010). A survey of the prevalence and genotypes of Giardia duodenalis infecting household and sheltered dogs. *Parasitology Research* 106, pp. 1015-1019.
- Sulaiman, I. M., & Cama, V. (2006). The biology of Giardia parasites. In Y. R. Ortega, *Foodborne Parasites* (pp. 15-32). New York, USA: Springer.
- Szabová, E., Juris, P., Miterpáková, M., Antolová, D., Papajová, I., & Sefciková, H. (2007). Prevalence of important zoonotic parasites in dog populations from the Slovak Republic. *Helminthologia* 44 (4), pp. 170-176.
- Tachezy, J., & Dolezal, P. (2011). The Giardia Mitossomes. In H. D. Luján, *Giardia* (pp. 185-187). Wien: Springer-Verlag.
- Tangtrongsup, S., & Scorza, V. (2010). Update on the diagnostic and management of Giardia spp infections in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, pp. 155-162.
- Thompson, A. R. (2000). Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology* 30, pp. 1259-1267.
- Thompson, A. R. (2004a). Epidemiology and zoonotic potential of Giardia infections. In C. Sterling, & A. Rodney, *The pathogenic enteric protozoa: Giardia, Entamoeba, Cryptosporidium and Cyclospora* (pp. 1-13). Tucson, Arizona: Kluwer Academic Publishers.
- Thompson, A. R. (2004b). The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and Giardiasis. *Veterinary Parasitology* 126, pp. 15-35.
- Thompson, A. R., Palmer, C. S., & O'Handley, R. (2008). The public health and clinical significance of Giardia and Cryptosporidium in domestic animals. *The Veterinary Journal* 177, pp. 18-25.
- Thompson, R., & Monis, P. (2004). Variation in Giardia: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology* 58, pp. 69-137.
- Thompson, R., Hopkins, R., & Homan, W. (2000). Nomenclature and genetic groupings of giardia infecting animals. *Parasitology Today Vol* 16, n° 5, pp. 210-213.
- Traub, R. J., Robertson, I. D., Irwin, P., Mencke, R., & Thompson, A. R. (2002). The role of dogs in transmission of gastrointestinal parasites in a remote tea-growing community in northeastern India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67(5), pp. 539-545.

- Upjohn, M., Cobb, C., Monger, J., Geurden, T., Claerebout, E., & Fox, M. (2010). Prevalence, molecular typing and risk factor analysis for *Giardia duodenalis* infections in dogs in a central London rescue shelter. *Veterinary Parasitology* 172, pp. 341-346.
- Wolfe, M. S. (1992). Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 5 (1), pp. 93-100.
- Xiao, L., & Fayer, R. (2008). Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology* 38, pp. 1239-1255.
- Yang, R., Reid, A., Lymbery, A., & Ryan, U. (2010). Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in fish. *International Journal for Parasitology* 40, pp. 779-785.

ANEXOS

Anexo 1 – Inquérito relativo aos dados gerais do canil/criador e individuais do animal

Inquérito

Tese de Mestrado FMV-UTL 2011/2012 - Giardia em canis de criação

Identificação

Nº da amostra: _____

Data: __/__/____

Nome do animal: _____

Idade _____

Sexo: _____

Espécie: _____

Raça: _____

Tipo de amostra (consistência):

Normal ☐

Mole ☐

Diarreia ☐

Tipo de Recolha:

Nº de recolhas: _____

Zaragatoa ☐

Directa ☐

Outro ☐

Obs: _____

Anamnese:

Alimentação

Ração Fisiológica ☐

Comida caseira ☐

Ração Terapêutica ☐

Tipo: _____

Habitat

Interior ☐

Exterior ☐

Misto ☐

Contacto com outros animais: ☐ Sim

☐ Não

Origem

Criador ☐

Petshop ☐

Centro de acolhimento ☐

Outro: _____

Interação com donos e membros da família:

Desparasitação interna:

Intervalo de administrações: 3 meses ☐ 4 meses ☐ Outro: _____

Princípios activos: _____

Vacinação: *Sim* ☐ *Não* ☐

Qual: _____

Desparasitação externa: Sim ☐ Substâncias activas: _____

Não ☐

Doenças e condições médicas pré-existent: _____

Medicação: Sim ☐ *Quais:* _____

Não ☐

Análise:

Exame directo ☐ *Flutuação fecal* ☐ *Coprocultura* ☐

Teste rápido (Speed®Giardia) ☐ IFD ☐ Outro: _____

Resultados:

[illegible]

Anexo 2 – Estudos de prevalência de *Giardia* em animais de canil e privados.

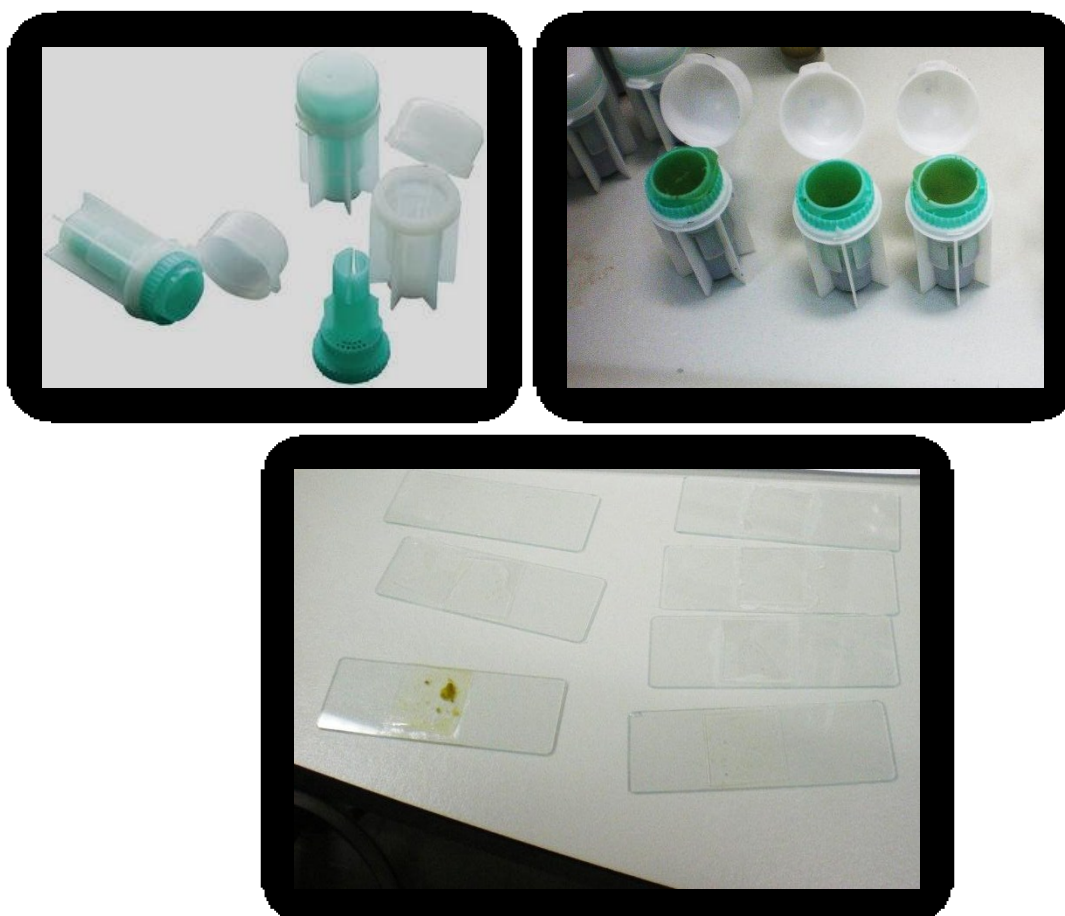
País/Região	Origem	Amostra	Prevalência (%)	Referência
Austrália	Canil/Dono	1400	9,3%	Palmer <i>et al</i> 2007
Bélgica	Dono	281	28,47%	Epe <i>et al</i> , 2010
Brasil/Uberlândia	Canil	199	49,7%	Mundim <i>et al</i> 2006
Brasil/São Paulo	Canil	129	24,8%	Katagiri & Oliveira-Sequeira, 2007
Espanha/Madrid	Canil	1161	7%	Miró <i>et al</i> , 2007
EUA	Canil/Dono	16064	15,6%	Carlin, Bowman, & Scarlett, 2006
Índia	Ind.	101	3%	Traub <i>et al</i> 2002
Itália/Roma	Canil	124	20,5%	Scaramozzino <i>et al</i> , 2009
Itália	Dono	1468	25,89%	Epe <i>et al</i> , 2010
Polónia	Dono/Canil	148	1,9%	Solarczyk <i>et al</i> , 2010
Reino Unido	Dono	260	14,62%	Epe <i>et al</i> , 2010
Rep. Checa/Praga	Canil	524	33%	Dubná <i>et al</i> , 2006
Roménia	Vários	614	8,5%	Mircean <i>et al</i> 2011

Anexo 3 – Método de flutuação passiva pelo método de Willis, através dos kits de amostras fecais da HenrySchein®

Os kits para análise fecal da HenrySchein® são compostos de 2 peças (Figura 19 – *Imagem esquerda*), uma interna (verde) que serve para a recolha da amostra e o recipiente externo (branco) onde a primeira se insere.

1. Após a recolha da amostra com a peça interna esta volta a ser encaixada no recipiente, adicionar a solução de ZnSO_4 até ao limite assinalado na parte lateral.
2. Homogeneizar os dois componentes através da rotação repetida da peça interna.
3. Adicionar solução de ZnSO_4 para preencher o recipiente até formar um menisco e colocar uma lamela no topo (Figura 19 – *Imagem direita*)
4. Após 15 minutos retirar a lamela, colocar numa lâmina e observar ao microscópio (Figura 19 – *Imagem inferior*)

Figura 19 – *Imagem esquerda*: Kit para análise de amostras fecais. *Imagem direita*: Kits com solução e lamela. *Imagem inferior*: Lâminas e lamelas para observação microscópica. Fonte: Original



Anexo 4 – Esfregaço fecal e coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada

I. Esfregaço fecal

Com o auxílio de uma vareta, retirar uma pequena amostra de fezes, distribuir ao longo de uma lâmina e deixar secar (Figura 20 – *Imagem direita*).

II. Técnica de Ziehl-Neelsen modificada (adaptado de Casemore, 1991)

Reagentes :

Metanol

Fucsina

Álcool Clorídrico 1%

Verde Malaquite 0,4%

- I. Fixar com metanol durante 1 minuto
- II. Cobrir a lâmina fucsina durante 10 minutos
- III. Lavar com água
- IV. Descolorar com álcool clorídrico a 1% até à eliminação do corante em excesso
- V. Lavar com água
- VI. Cobrir a lâmina com Verde Malaquite a 0,4% durante 30 segundos (Figura 20 – *Imagem direita*)
- VII. Deixar secar e observar ao microscópio na objectiva de 100x com óleo de imersão

Figura 20 – *Imagem superior*: Suporte para lâminas e reagentes. *Imagem esquerda*: Lâminas após esfregação. *Imagem direita*: Lâminas após coloração. Fonte: Original



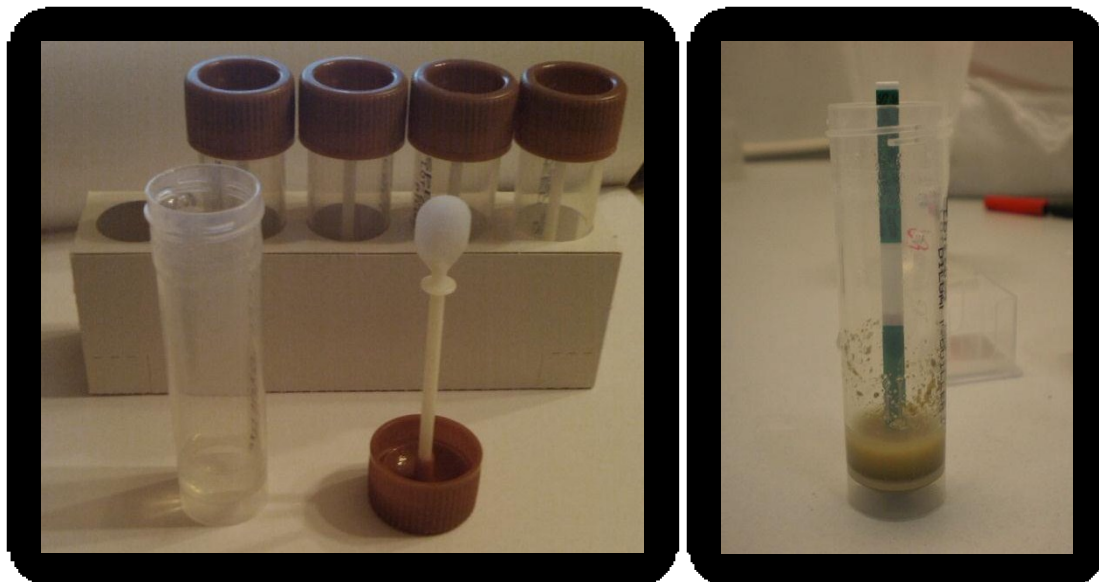
Anexo 5 – Kit teste rápido Speed® *Giardia*

O teste rápido Speed® *Giardia*, de acordo com as indicações do fabricante (BVT, Virbac), baseia-se numa tira imunocromatográfica capaz de detectar antígenos dos quistos de *Giardia duodenalis* com uma sensibilidade de 95,6% e especificidade de 100% num limiar de detecção de 80 quistos por grama de fezes. Pode ser armazenado até 16 meses a temperatura ambiente e a sua preparação e leitura demora apenas 10 minutos.

I. Protocolo de procedimento:

1. Identificar o frasco contendo o reagente e recolher a matéria fecal com o auxílio da colher de colheita (Figura 21 – *Imagem esquerda*). Adicionar à solução reagente o equivalente a 1 colher cheia. Fechar o frasco e homogeneizar o seu conteúdo.
2. Deixar sedimentar durante 3 min
3. Mergulhar cuidadosamente no frasco uma fita teste seguindo o sentido da seta e evitando o contacto com a sua zona central reagente. Deixar repousar 1 minuto na solução (Figura 21 – *Imagem direita*).
4. Retirar a fita e colocá-la sobre uma superfície horizontal limpa.
5. Após a migração fazer a leitura.

Figura 21 – *Imagem esquerda*: Frasco com reagente e colher. *Imagem direita*: Fita de teste em solução. Fonte: Original



II. Leitura e interpretação dos resultados

Ler o resultado após 5 minutos de migração: Uma banda azul – resultado negativo (Figura 22); Uma banda azul e uma banda vermelha – resultado positivo (Figura 23). Uma ligeira coloração rosada da banda teste é considerada como resultado positivo. O resultado deste teste biológico deve ter sempre em consideração o contexto clínico e epidemiológico do animal em questão.

Figura 22 – Tira imunocromatográfica Speed® *Giardia* – Resultado negativo. Fonte: Original



Figura 23 - Tira imunocromatográfica Speed® *Giardia* – Resultado positivo. Fonte: Original



Anexo 6 – Dados do canil 1 recolhidos através dos inquéritos

Amostra	Grupo Etário	Sexo	Raça	Vacinação	Medicação	Doença	D. int	D. ext	Fezes	Speed	Willis	Ziehl-Neelsen
1	Jovens	F	Pinscher	N	N	-	NR	NR	Normal	+	+	+
2	Adultos	F	Pinscher	N	N	-	NR	NR	Normal	+	+	+
3	Adultos	F	Pinscher	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
4	Adultos	F	Bulldog Francês	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
5	Adultos	M	Pinscher	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
6	Adultos	F	Pug	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
7	Jovens	M	Bulldog Inglês	N	N	-	NR	NR	Normal	+	+	+
8	Adultos	F	Pug	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
9	Adultos	F	Bulldog Francês	N	N	-	NR	NR	Normal	+	+	+
10	Adultos	F	Bulldog Francês	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
11	Adultos	F	Bulldog Francês	N	N	-	NR	NR	Normal	+	+	+
12	Adultos	F	Pug	N	N	Sarna (ind)	NR	NR	Normal	+	+	+
13	Adultos	M	Bulldog Francês	N	N	-	NR	NR	Diarreia	-	-	-
14	Adultos	F	Bulldog Inglês	N	N	Leishmaniose	NR	NR	Normal	-	-	-
15	Adultos	F	ShiTzu	N	N	-	NR	NR	Normal	+	+	+
16	Adultos	M	Pug	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
17	Seniores	F	Golden Retriever	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-

18	Adultos	M	Cocker Spaniel	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
19	Adultos	F	Golden Retriever	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
20	Adultos	M	Basset Hound	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
21	Adultos	F	Basset Hound	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
22	Adultos	F	Basset Hound	N	N	-	NR	NR	Normal	+	-	-
23	Seniores	F	Yorkshire Terrier	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
24	Adultos	F	Yorkshire Terrier	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
25	Adultos	M	Yorkshire Terrier	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
26	Adultos	F	Yorkshire Terrier	N	N	-	NR	NR	Normal	+	+	+
27	Adultos	F	Bulldog Inglês	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
28	Jovens	F	Bulldog Inglês	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
29	Jovens	F	Bulldog Inglês	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
30	Adultos	F	Pinscher	N	N	-	NR	NR	Normal	+	+	+
31	Adultos	M	Cocker Spaniel	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
32	Adultos	M	Bulldog Francês	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
33	Adultos	F	Cocker Spaniel	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
34	Adultos	F	Cocker Spaniel	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
35	Seniores	M	Cocker Spaniel	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
36	Seniores	M	Cocker Spaniel	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
37	Seniores	M	Cocker Spaniel	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-

38	Seniores	M	Golden Retriever	N	N	Insuf cardíaca/Tumor perianal	NR	NR	Normal	-	-	-
39	Adultos	F	Cocker Spaniel	N	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
40	Jovens	M	Pastor Alemão	N	N	Parvovirose	NR	NR	Mole	-	-	-
41	Seniores	F	Cocker Spaniel	S	S	Tumor hepático	R	R	Normal	-	-	-
42	Jovens	M	Retriever do Labrador	S	S	Fractura proximal do rádio	NR	NR	Normal	-	-	-
43	Jovens	M	Caniche	S	S	-	NR	NR	Diarreia	-	-	-
44	Adultos	F	Bulldog Francês	S	N	-	NR	NR	Normal	-	-	-
45	Jovens	F	Cocker Spaniel	S	N	Queiletiolose	R	R	Mole	+	+	-

Legenda – N – não; S-sim; NR – não regular; R - regular

Anexo 8 - Dados do canil 2 recolhidos através dos inquéritos

Amostra	Grupo Etário	Sexo	Raça	Vacinação	Medicação	Doença	D. Interna	D. Externa	Fezes	Speed	Willis	Ziehl-Neelsen
1	Adulto	F	Bouvier Bernois	Regular	-	-	Regular	Regular	Normal	-	-	-
2	Adulto	F	Bouvier Bernois	Regular	-	-	Regular	Regular	Normal	-	-	-
3	Adulto	F	Retriever do Labrador	Regular	-	-	Regular	Regular	Normal	-	-	-
4	Jovem	F	Doberman	Regular	-	-	Regular	Regular	Normal	-	-	-
5	Adulto	M	Bouvier Bernois	Regular	-	-	Regular	Regular	Normal	-	-	-
6	Adulto	M	Doberman	Regular	-	-	Regular	Regular	Normal	-	-	-

Anexo 8 - Imagens recolhidas no estudo prático

Figura 24 - Quisto de *Giardia*. Flutuação passiva com ZnSO_4 , Objectiva 40x. Fonte: Original



Figura 25 - Quisto de *Giardia*. Flutuação passiva com ZnSO_4 , objectiva 10x. Fonte: Original

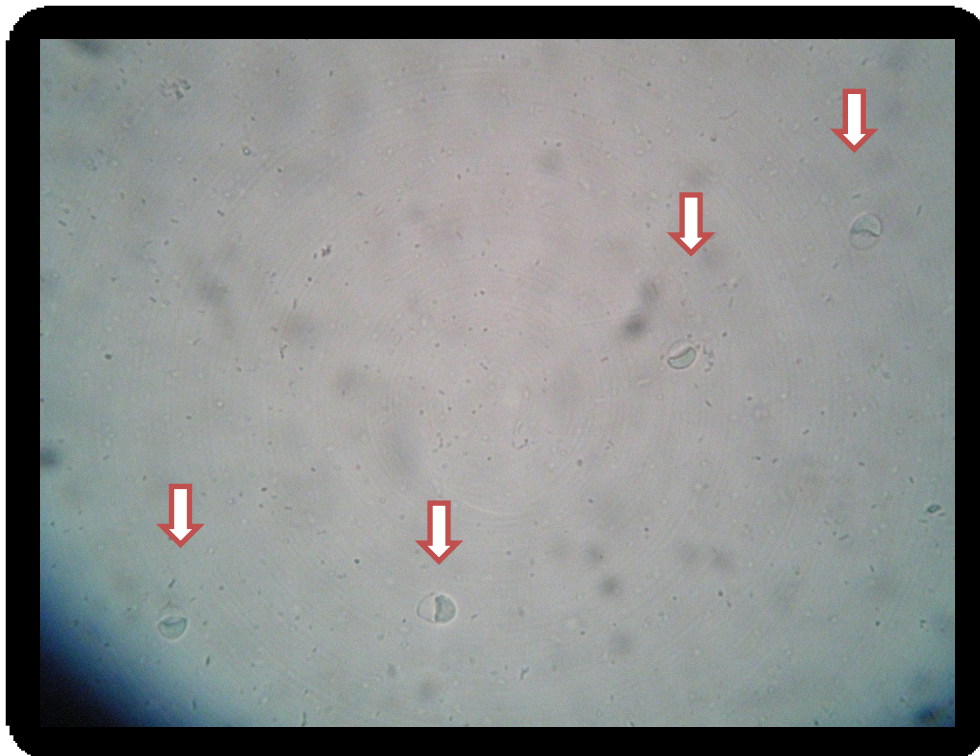


Figura 26 - Quisto de *Giardia*. Flutuação passiva com ZnSO_4 , objectiva 100x. Fonte: Original

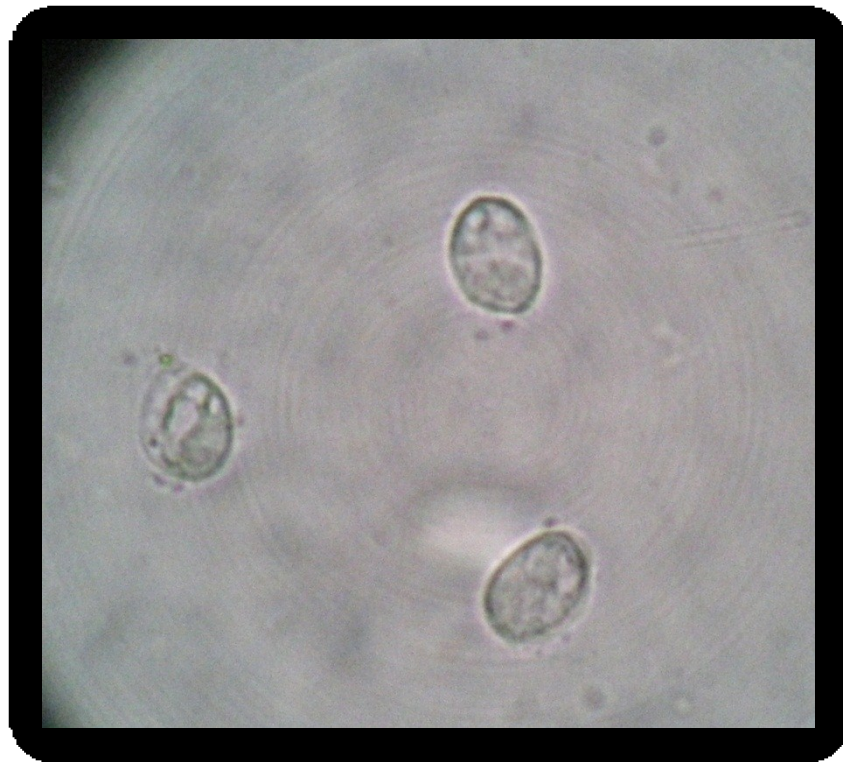


Figura 27 - Quisto de *Giardia*. Coloração com técnica de Ziehl-Neelsen modificada, objectiva 100x.
Fonte: Original

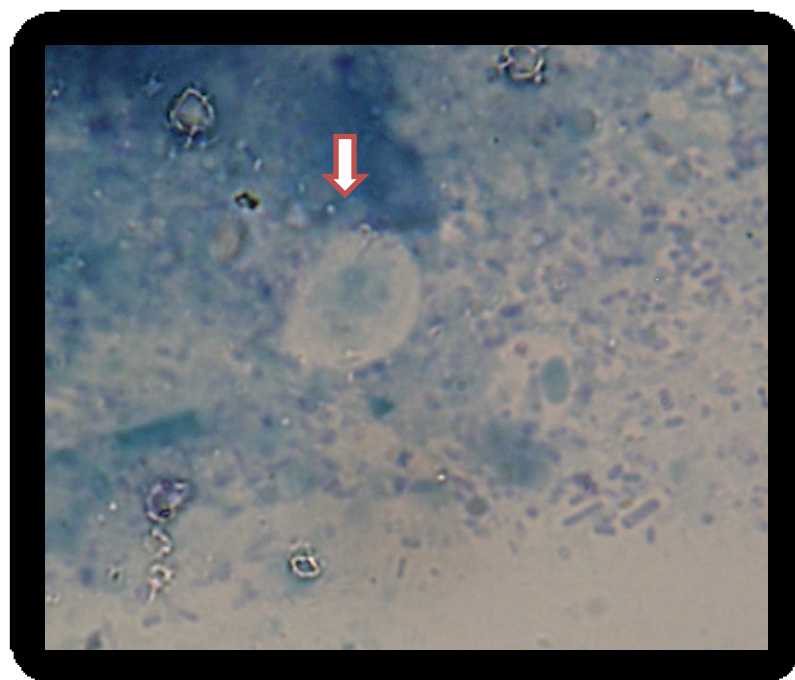


Figura 28 – *Toxascaris leonina*, flutuação passiva com ZnSO_4 , objectiva. 10x. Fonte:Original

